Untersuchungen mit photodynamischen Stoffen

(photobiologischen Sensibilisatoren).

Inaugural-Dissertation

der

Hohen naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Tübingen

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Diplomingenieur **Adolf Reitz**
aus Stuttgart.

Jena,
Gustav Fischer
1907.

Untersuchungen
mit photodynamischen Stoffen

(photobiologischen Sensibilisatoren).

Inaugural-Dissertation

der

Hohen naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Tübingen

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Diplomingenieur **Adolf Reitz**
aus Stuttgart.

ACAD. LANDWIRT. BIBL.

Jena,
Gustav Fischer
1907.

Von der Fakultät angenommen den 19. Juli 1907.

Die Beobachtung, daß fluoreszierende Stoffe im Licht Protozoen in einer Verdünnung abtöten, in der im Dunkeln keine Einwirkung beobachtet werden kann, hat zuerst Raab (1) im Jahre 1898 gemacht. Raab machte unter Leitung von v. Tappeiner Versuche über die Einwirkung von Akridinlösungen auf Protozoen. Da die Versuche, mit denselben Verdünnungen, an derselben Protozoenart, jedoch an verschiedenen Tagen ausgeführt, gänzlich voneinander abweichende Resultate ergaben, so wurden die Versuche auch nach der Richtung hin erweitert, wie weit die Belichtungsverhältnisse an dem verschiedenen Ausfall der Versuche Anteil hätten. Diese Versuche ergaben nun das überraschende Resultat, daß Paramäcien in einer Akridinlösung von 1:20000 im Sonnenlicht in 6 Minuten, im zerstreuten Tageslicht in ca. 60 Minuten starben, im Dunkel jedoch noch nach 60000 Minuten am Leben waren.

Bevor man als Ursache eine besondere Lichtwirkung annehmen konnte, mußte die Wärmewirkung der strahlenden Energie ausgeschaltet werden. Jedoch auch bei Ausschaltung dieser war die Wirkung dieselbe. Es handelte sich also um eine neue Lichtwirkung, die v. Tappeiner (2) mit dem Namen Photodynamie belegte.

Es lag der Gedanke nahe, die besondere Lichtwirkung des Akridins mit einer Eigenschaft des Akridins in Zusammenhang zu bringen, die sehr auffallend ist, seiner Fluoreszenz.

Fluoreszierende Stoffe sind solche, die unter dem Einfluß des Lichts selbstleuchtend werden; die absorbierten Lichtstrahlen werden in solche von anderer Wellenlänge umgewandelt, eine Erscheinung, die von Stokes (3) zum erstenmals an Flußspat (Fluorcalcium) beobachtet wurde und nach diesem Mineral den Namen führt.

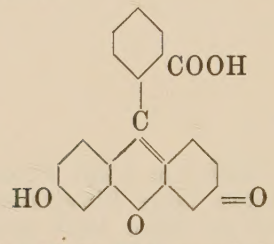
Versuche mit anderen Stoffen, welche die Eigenschaft der Fluoreszenz mit dem Akridin teilen (Phosphin, Eosin, Chinolinrot, Harmalin, Chinin) einerseits, und Versuche mit nicht fluoreszierenden Stoffen andererseits ergaben, daß nur die fluoreszierenden Stoffe „photodynamisch“ wirkten.

Ueber die Stoffe, die v. Tappeiner und Jodlbauer (4) zu ihren Versuchen mit Paramaecium caudatum heranzogen, sei folgendes erwähnt. (Vordem ist zu bemerken, daß diese Forscher zu ihren Versuchen in der Regel als Lichtquelle zerstreutes Tageslicht nahmen. Die Paramäcien gegen die Wärmewirkung der strahlenden Energie zu schützen, war in diesen Fällen nur an hellen Tagen des Frühjahrs und des Sommers nötig.)

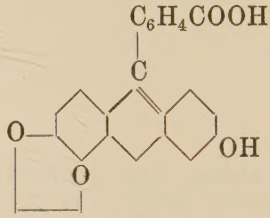
1. Substanzen mit selektiver Absorption im sichtbaren Teil des Spektrums (Farbstoffe).

a) Gruppe des Fluoresceins.

Untersucht wurden Fluorescein, Dichlorfluorescein, Dibromfluorescein, Dijodfluorescein, Tetrachlorfluorescein, Tetrabromfluorescein, Tetrajodfluorescein, Dichlortetrabromfluorescein, Dichlortetrajodfluorescein, Tetrachlortetrajodfluorescein, Tetrabromfluoresceinäthyläther, Dichlortetrabromfluoresceinäthylester, Tetraäthyl-Rhodamin, Tetraäthyl-Rhodaminäthylester.



oder



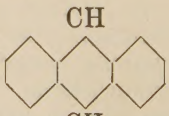
Fluorescein

Sämtliche Fluoresceinsubstitutionsprodukte zeigten sehr starke photodynamische Wirkung. v. Tappeiner und Jodlbauer machten die wichtige Beobachtung, daß „in einer Gruppe chemisch verwandter fluoreszierender Stoffe in der Regel die photodynamische Wirkung um so größer ist, je geringer die Fluoreszenzhelligkeit ist“ (vorausgesetzt, daß letztere Größe nicht unter ein gewisses Minimum sinkt).

Substanz	Fluoreszenzhelligkeit	Giftigkeit für Paramäcien im zerstreuten Tageslicht, jene im Dunkeln = 1 gesetzt	Schädigung des Invertin in Proz. Expositionszeit 3 Std.
Fluorescein	sehr stark	11	0
Tetrachlorfluorescein	stark	35	10
Tetrabromfluorescein	mäßig	60	57
Tetrajodfluorescein	sehr schwach	80	89
Dichlortetrabromfluorescein	nur mit Linse im Sonnenlicht bemerkbar	150	89
Dichlortetrajodfluorescein	do.	100	96
Tetrachlortetrajodfluorescein	„	170	89

Von der Regel, daß die photodynamische Wirkung um so größer ist, je geringer die Fluoreszenzhelligkeit ist, scheint der von Busck (5) untersuchte Körper Tetrachlortetrabromfluoresceinkalium abzuweichen. Dieser Stoff, dessen stark grüne Fluoreszenz noch in Verdünnungen von 1:200000000 beobachtet werden konnte, zeigte eine größere photodynamische Wirkung als das schwach fluoreszierende Tetrajodfluorescein.

b) Gruppe des Anthracens.



Anthracen.

Untersucht wurden Anthracen-α-monosulfosaures Kali, α-anthracendisulfosaures Natrium, β-anthracendisulfosaures Natrium, Dichloranthracendisulfosaures Natrium.

Die stärkste photodynamische Wirkung zeigte das dichloranthracendisulfosaure Natrium. (Uebrigens ein Stoff, der in gelblicher Lösung bei Verdünnung sehr lebhaft fluoresziert.) Es finden sich nämlich folgende Angaben:

Konzentration	Hell	Dunkel
1 : 75	sofort tot	alle lebend nach 48 Stunden
1 : 200	tot nach 10 Min.	do.
1 : 1000	„ „ 15 „	„
1 : 5000	„ „ 25 „	„
1 : 20 000	„ „ 45 „	„
1 : 40 000	„ „ 1 Std.	„
1 : 100 000	„ „ 1½ „	„
1 : 200 000	„ „ 12 „	„
1 : 400 000	„ „ 16 „	„
1 : 1 000 000	„ „ 26 „	„
1 : 2 000 000	die Hälfte tot nach 26 Std.	„

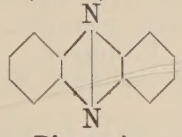
c) Gruppe des Akridins.

Akridin

Untersucht wurden salzsaures Akridin, salzsaures Chrysanilin, salzsaures Benzoflavin.

Alle Akridinderivate übten im Licht eine intensive Wirkung auf Paramäcien aus.

d) Gruppe des Phenazins (Azine).

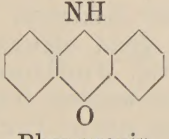


Phenazin

Untersucht wurden aus dieser Gruppe Phenazinchlorid, Diamidophenazinchlorid, Dimethyldiamidotoluphenazinchlorid, Phenosafraninchlorid, Tolusafranin, Rosindulinchlorid, phenylrosindulintrisulfosaures Natrium, Magdalarot (L. Durand, Huguenin & Co.), salzsaures Naphtylrot, Aposafranin, fluorindisulfosaures Natrium.

Außer dem fluorindisulfosauren Natrium zeigen alle untersuchten Phenazinderivate eine stark photodynamische Wirkung.

e) Gruppe des Phenoxazins (Oxazine).



Phenoxazin

Untersucht wurden Nilblau A, Resorufin, fluoreszierendes Blau (Ammoniaksalz des Tetrabromresorufin).

Sehr starke Wirkung zeigte Nilblau A, stark wirksam, jedoch weniger stark als dieses, waren Resorufin und fluoreszierendes Blau.

f) Gruppe des Thiodiphenylamins (Thiazine).

Thiodiphenylamin

Untersucht wurden Methylenblau, Thionol, dehydrothiotoluidindisulfosaures Natrium.

Sehr starke Wirkung (in Konz. 1 : 200000 tot nach 30 Min.) zeigte Thionol. Die Wirkung der anderen Thiodiphenylaminderivate war ebenfalls eine starke.

g) Gruppe der Chinolinfarbstoffe (kondensierte Chinoline).

Untersucht wurden Chinolinrot, Chinolinblau (Cyanin). Letzteres wirkte sehr stark photodynamisch.

2. Substanzen mit Absorption im Violett bezw. Ultraviolett. Naphtalingruppe.

Untersucht wurden α-Naphtoltrisulfosäure (1.3.6.8), β-Naphtoltrisulfosäure (2.3.6.8), 2-5-Amidonaphtol-7-monosulfosäure, α-Naphtylamindisulfosäure S, β-Naphtylaminodisulfosäure C, Naphtionsäure, Naphtsultan-2-4-disulfosäure.

Die photodynamische Wirkung der Naphtalinderivate war schwach.

Außer diesen genannten Stoffen gelangten zur Prüfung Tetraamidostilbenchlorür, γ-Phenylchinaldinchlorid, Chininsulfat, Chininbisulfat, Hydrastininchlorid, Harmalinchlorid, Aeskulin.

Tetraamidostilbenchlorür war sehr giftig. Die Substanz zersetzt sich im Licht. γ-Phenylchinaldinchlorid wirkte sehr stark photodynamisch, die Chininsalze sehr schwach, Hydrastininchlorid sehr stark, Harmalinchlorid schwach, Aeskulin kaum merklich.

Versuche mit anderen Protozoen, Amoeba proteus, Bodo saltans zeigten analoge Verhältnisse wie bei Paramaecium caudatum.

Die Anthrachinone, über deren photodynamisches Verhalten v. Tappeiner (6) Versuche anstellte, zeigten dieselbe Eigenschaft, auf Paramäcien bei Licht intensiver einzuwirken, als im Dunkeln. Es wurden untersucht anthrachinon-α-monosulfosaures Kali, 2-7-anthrachinondisulfosaures Natrium, chrysophansaures Natrium. Sehr starke Wirkung wie die Dichloranthracendisolfosäure zeigte letztere Verbindung.

Nach diesen überraschenden Resultaten, die bei allen diesen Paramäcienversuchen erzielt wurden, war es wünschenswert, zu untersuchen, ob auch bei Bakterien, bei Fadenpilzen eine photodynamische Wirkung sich erzielen läßt.

Die ersten Versuche mit Bakterien machte wiederum Raab (7). Jedoch waren die Versuche nicht einwandfrei angeordnet, weshalb sie von v. Tappeiner und von Jodlbauer (8) wieder aufgenommen wurden. Zu den Versuchen wurden Bac. prodigiosus, Proteus vulgaris und Bacterium acidi lactici benutzt. Als photodynamische Substanzen fanden bei den Versuchen mit Bac. prodigiosus Eosin (0,1—0,2-proz.), Erythrosin (0,05—0,1-proz.), Methylenblau (0,0005 bis 0,001-proz.), zu den Versuchen mit Proteus vulgaris Eosin 0,1-proz., Erythrosin (0,05—0,1-proz.), Rose bengale (Tetrachlortetrajodfluorescein-Natrium) 0,05-proz., Phenosafraninchlorid 0,001-proz.,

Methylenblau (0,001—0,005-proz.), dichloranthracendisulfosaures Natrium (0,05—0,1-proz.), zu den Versuchen mit Bacterium acidi lactici Eosin (0,05—0,1-proz.), Erythrosin (0,05—0,1-proz.), Methylenblau (0,001 bis 0,005-proz.), dichloranthracendisulfosaures Natrium (0,05—0,1-proz.) Verwendung.

Die Versuche wurden so angestellt, daß eine Anzahl sehr dünnwandiger Reagenzcylinder von 14 mm Durchmesser mit je 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung paarweise mit 0,1 ccm einer Lösung von fluoreszierender Substanz bekannter Konzentration versetzt wurden. Zur Kontrolle wurde einigen Röhren nur destilliertes Wasser zugesetzt. Nach der Sterilisation wurden in jedes Glas 0,5 ccm einer 24 Stunden alten Bouillonkultur gebracht. Die eine Hälfte der Cylinder wurde an einem offenen Fenster (Norden) 7 Tage lang bei den Versuchen mit Bac. prodigiosus, 10 Tage lang bei den Versuchen mit Proteus vulgaris dem zerstreuten Tageslicht ausgesetzt. Die andere Hälfte der Gläser blieb im Dunkeln. Am Abend jeden Tages wurde aus jeder Röhre mittelst Platinöse in verflüssigte Gelatine übertragen, aus dieser eine Oese in eine zweite Gelatine und aus dieser zweiten zwei Oesen in eine dritte. Mit den Gelatineröhren wurden Petri-Schalen gegossen und letztere im Dunkel bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach 3 Tagen wurde das eingetretene Wachstum festgestellt. Bei den Versuchen mit Bacterium acidi lactici verfuhren die Verfasser so, daß sie am Ende jedes Expositionstages in sterilisierte Gärungssaccharometer das Material übertrugen. Die Saccharometer waren mit 2-proz. Traubenzuckerbouillon gefüllt und wurden nach der Impfung in den Brutschrank bei 37° gestellt.

Die Resultate waren überraschend: Vollständige Tötung trat bei Bacillus prodigiosus erst nach 5—7 Tagen Expositionszeit bei den Versuchen mit Eosin (0,1—0,2-proz.) und Erythrosin (0,05—0,1-proz.) ein, nach 2-tägiger Expositionszeit bei Erythrosin (0,2-proz.), nach 3-tägiger Exposition bei Methylenblau (0,0005-proz.), nach 2-tägiger Exposition bei Methylenblau (0,001-proz.). Bei den Untersuchungen mit Proteus vulgaris ergab sich unvollständige Tötung bei Eosin (0.1-proz.) nach 10 Tagen Exposition, vollständige Tötung bei Erythrosin (0,05—0,1-proz.) nach 2—3 Tagen Exposition, bei Rose bengale (0,05-proz.) nach 1—2 Tagen Exposition, bei Phenosafraninchlorid (0,001-proz.) nach 1 Tag, bei Methylenblau (0,001—0,005-proz.) nach 1—2 Tagen, und die bei Paramäcien so außerordentlich wirksame Dichloranthracendisulfosäure (0,05—0,1-proz.) blieb ohne jede bemerkbare Wirkung. Bei den Versuchen mit Bacterium acidi lactici ergab sich folgendes:

	1 Tag		2 Tage		3 Tage		4 Tage	
	Hell	Dunkel	Hell	Dunkel	Hell	Dunkel	Hell	Dunkel
Ohne Zusatz	2,5	2,3	1,5	1,4	1,3	1,4	1,0	1,0
Eosin 0,05-proz.	—	—	—	—	1,3	1,1	0,6	0,7
Eosin 0,1-proz.	—	—	—	—	1,2	1,0	0,6	1,6
Erythrosin 0,05-proz.	—	—	—	—	0,8	0,8	0	0,8
Erythrosin 0,1-proz.	2,7	2,9	1,0	2,0	0	1,8	0	1,2
Methylenblau 0,001-proz.	0,4	2,9	0	2,2	0	0,8	0	1,0
Methylenblau 0,005-proz.	0	2,7	0	1,0	0	0,5	0	0,5
Dichloranthracendisulfosaures Natrium 0,05-proz.	2,7	2,5	2,0	2,0	0,8	1,0	1,0	1,2
Dichloranthracendisulfosaures Natrium 0,1-proz.	2,7	2,5	2,7	2,5	1,4	1,3	1,0	1,3

Die Schädigung im Dunkeln, die sich aus den oben angegebenen Zahlen ergibt, läßt sich auf die ungünstigen Ernährungsbedingungen zurückführen. Eosin (0,05-proz.) zeigte sogar nach 8-tägiger Exposition keine bemerkbare Einwirkung, ebenso blieb Dichloranthracendisulfosäure ohne jede Wirkung.

Diese Versuche zeigen, daß alle die verwendeten photodynamischen Stoffe in ihrer Wirkung auf Bakterien weit hinter der auf Paramäcien zurückstehen. Für die ungleiche Wirkung der einzelnen Stoffe (Dichloranthracendisulfosäure!) glauben v. Tappeiner und Jodlbauer in der Angabe von Nakanishi (9) eine Stütze zu finden, der fand, daß sich von zahlreichen untersuchten Farbstoffen das Methylenblau zur Lebendfärbung am geeignetsten erwies, daß die derbe Membran der Bakterien für die fluoreszierenden Stoffe in ungleichem Grade durchlässig ist.

Weitere Versuche über die Einwirkung photodynamischer Stoffe auf Bakterien wurden von Mettler (10) gemacht. Mettler arbeitete mit Eosin, Erythrosin und Fluorescein. Als Bakterien dienten ihm Choleravibrio, Staphylococcus pyogenes aureus, Typhusbacillus, Bact. coli commune und Bact. phosphorescens. Mettler fand ebenfalls wie v. Tappeiner, daß die entwicklungshemmende Wirkung auf Agar- und Gelatineplatten, die mit den von ihm untersuchten Bakterienarten infiziert worden waren, erhöht wird, wenn dem Nährboden geringe Mengen fluoreszierender Stoffe beigemengt worden waren. Neben Sonnenlicht und diffusem Tageslicht konnte auch mit elektrischem Bogenlicht die entwicklungshemmende Wirkung, wenn auch in geringerem Grade, nachgewiesen werden, währenddem das Gasglühlicht auf die Lebensfähigkeit auch nach mehrtägiger Exposition eine deutliche Wirkung nicht ausübte. Wurde das Tageslicht durch eine verdünnte Lösung eines photodynamischen Stoffes filtriert, so konnte eine Erhöhung des schädigenden Einflusses nicht konstatiert werden.

Huber (11) prüfte die Wirkung des Tageslichts auf die Lebensfähigkeit und die Virulenz von Streptococcus pyogenes aureus und Bacillus diphtheriae bei Anwesenheit photodynamischer Stoffe. Auch er fand, daß die Wirkung des Sonnenlichts bezw. Tageslichts auf die Lebensfähigkeit und Virulenz erhöht wurde durch das Vorhandensein von Eosin und Erythrosin.

Essinger (12) führte einige Versuche an Fadenpilzen aus. Zu den Versuchen wurden Penicillium glaucum und Achorion Schoenleinii benützt. Die Untersuchungsmethode war folgende:

In dünnwandige Reagenzgläschen wurden je 10 ccm verdünnter Bierwürze gebracht (1 Teil Bierwürze, 5 Teile physiologischer Kochsalzlösung) und dann 7 Paare je mit einer Lösung eines verschiedenen fluoreszierenden Stoffes versehen. Die Lösungen waren in einer solchen Konzentration hergestellt, daß überall 0,2 ccm erforderlich waren, um in der Bierwürze die nachgenannten Verdünnungen zu erzielen:

Methylenblau	0,001-proz.
Phenosafranin	0,001 „
Eosin	0,05 „
Erythrosin	0,05 „
Rose bengale	0,05 „
Dichloranthracendisulfosaures Natrium	0,05 „
Akridinchlorid	0,002 „

Das Resultat war folgendes: In allen Lösungen war nach 2 Tagen Wachstum aufgetreten, gleichviel in hell und dunkel. Nach 8 Tagen zeigte sich, daß die Kolonieen sich durchweg in der Tiefe befanden (Sauerstoff-

wirkung). Photodynamisch unwirksam waren Methylenblau und dichloranthracendisulfosaures Natrium, wenig wirksam waren Eosin und Akridin, eine größere Wirksamkeit war bei Erythrosin konstatiert worden. Abgetötet waren die Kulturen in Rose bengale und Phenosafranin. Am 10. Tage wurde Wachstum festgestellt bei Methylenblau, Dichloranthracendisulfosäure. Abtötung war erfolgt in Erythrosin, Phenosafranin und Rose bengale. Letzteres hatte auch in den im Dunkeln gehaltenen Röhrchen abtötend gewirkt, war also giftig. Die Versuche in zehnmal niedrigerer und in zehnmal höherer Konzentration hatten das Resultat, daß beidemal eine viel geringere bezw. gar keine Wirkung zu konstatieren war. Die Beobachtung, daß die photodynamische Wirkung da am größten war, wo Sauerstoff zugegen war, veranlaßte Essinger, Schüttelversuche vorzunehmen, wobei die exponierten Röhrchen während der Dauer des ganzen Versuchs mit Luft in Berührung kamen. Dichloranthracendisulfosäure erwies sich wiederum als wirkungslos, während bei Rose bengale und Phenosafranin eine stärkere photodynamische Wirkung, ebenso bei Eosin, Akridin und Methylenblau sich wahrnehmen ließ. Achorion Schoenleinii war gegenüber der photodynamischen Wirkung wesentlich empfindlicher. Die obengenannten Konzentrationen von Eosin, Erythrosin, Rose bengale, Phenosafraninchlorid, Methylenblau, Akridinchlorid hatten bereits nach 1-tägiger Expositionszeit abtötend gewirkt. Dichloranthracendisulfosäure war auch hier wirkungslos.

Es zeigte sich also bei diesen Fadenpilzen ein erheblicher Unterschied gegenüber der Wirkung auf Paramäcien. Die photodynamische Wirkung war wesentlich schwächer. Auch hier trat die merkwürdige Erscheinung zu Tage, daß die auf Paramäcien stark photodynamisch wirkende Dichloranthracendisulfosäure völlig wirkungslos war. v. Tappeiner und Jodlbauer (13) führen auch hier die Ursache auf die derbere Membran der Fadenpilze zurück, wodurch der Eintritt der wirksamen Substanz verhindert bezw. verzögert wird. Sie ziehen daraus den Schluß, daß die photodynamische Wirkung bezw. das Auftreten von Ionen (Elektronen), mit der die photodynamische Erscheinung wahrscheinlich in Verbindung steht, nur im unmittelbaren Bereich der Moleküle der fluoreszierenden Substanz stattfindet.

Die Untersuchungen wurden von v. Tappeiner und Jodlbauer (14) auch auf Enzyme ausgedehnt. Auf Invertin photodynamisch wirksam erwiesen sich die Fluoresceinderivate (ausgenommen Fluorescein selber und seine Chlorderivate), die Gruppe des Anthracens, die Gruppe des Thiazins, und die Chinolinfarbstoffe. Unwirksam waren die Phenazinderivate (außer Phenazin und Phenosafranin), Phenoxazine, Naphtalingruppe, Phenylchinaldin, Chinin, Harmalin, Hydrastinin, Aeskulin.

Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß die Einwirkung der photodynamischen Stoffe auf das in Wasser aufgeschwemmte „ruhende“ Enzym wesentlich intensiver war, als bei dem mit Zuckerlösung versetzten tätigen. Die photodynamischen Wirkungen zeigten sich schon bei Zusatz ganz geringer Mengen (bei Eosin und Erythrosin noch in millionenfacher Verdünnung). Das Invertin, auf das die photodynamischen Stoffe einwirkten, ist dauernd geschädigt.

Die Einwirkung der photodynamischen Stoffe auf Invertin im Dunkeln war verschieden. Keine Einwirkung zeigte die Fluoresceingruppe, hemmend wirkten salzsaures Dimethylphosphin, Phenosafranin, Aposafranin, Safranin T, befördernd z. B. salzsaures Akridin, Dichloranthracendisulfosäure.

Huber machte Untersuchungen mit dem Labferment und fand, daß dasselbe nach mehrstündiger Exposition am Tageslicht nur wenig von seiner milchgerinnenden Eigenschaft einbüßt, bei Zusatz von Eosin und Erythrosin dagegen nach kurzer Belichtung eine deutliche Verlangsamung der Gerinnung eintritt. Die schädigende Wirkung war viel stärker bei Luftzutritt als bei Luftabschluß.

Von weiteren Fermenten wurden nach dieser Richtung untersucht Diastase, Papayotin, Zymase. Die Untersuchungen wurden von Stark und Liebel (15), Tillmetz (16), Rehm (17), Riegner (18), Quiring (19), und Locher (20) ausgeführt.

Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Toxine wurden von v. Tappeiner und Jodlbauer (21) Versuche gemacht. Die Versuche wurden mit folgenden Substanzen ausgeführt: Fluorescein-Natrium (0,05-proz.), Eosin (0,05-proz.), Erythrosin (0,05-proz.), Dimethylphosphinchlorid (0,05-proz.), Chinolinrot (0,01-proz.), Harmalinchlorid (0,05-proz.), Aeskulin (0,05-proz.), Azobordeaux (0,05-proz.), Fuchsin (0,05-proz.), Azofuchsin (0,05-proz.).

Zu den Versuchen dienten Ricin, Crotin, Diphtherietoxin, Tetanustoxin, Tetanusantitoxin. Die Resultate waren folgende:

In den Dunkelflaschen und in den Lichtflaschen ohne Zusatz war nach 6 Tagen noch keine merkbare Abnahme des Agglutinierungsvermögens des Ricins zu konstatieren. In den Lichtflaschen mit fluoreszierenden Zusätzen war eine Abnahme des Agglutinierungsvermögens bereits nach dem 1. Tage zu beobachten. Nach 6 Tagen war es vollständig aufgehoben. Nur bei Aeskulin blieb es vollständig erhalten, ebenso bei den Nichtfluoreszenten Azobordeaux, Azofuchsin und Fuchsin. Die Allgemeinwirkung des Ricins wurde durch Fluorescein, Eosin, Harmalin und Chinolinrot in zerstreutem Tageslicht soweit aufgehoben, daß die 5—10-fache letale Dosis von den Tieren ertragen wurde. Die hämolytische Wirkung des Crotins wurde durch Fluorescein, Eosin, Rose bengale bei längerer Exposition aufgehoben. Keine Einwirkung zeigte Akridinchlorid. Diphtherietoxin wurde von Eosin und dichloranthracendisulfosaurem Natrium durch 3-tägige Exposition in zerstreutem Tageslicht mäßiger Intensität so geschädigt, daß Meerschweinchen nach Injektion der 120-fachen letalen Dosis gesund blieben. Schwächer wirkten Fluorescein und Methylenblau. Tetanustoxin wurde durch 3-tägige Exposition mit Eosin in zerstreutem Tageslicht mäßiger Intensität so geschädigt, daß Mäuse nach subkutaner Injektion der 1—10-fachen letalen Dosis am Leben blieben. Auf Tetanusantitoxin wirkte Eosin im Licht schädigend ein. Nach 3 Tagen Exposition in zerstreutem Tageslicht von mäßiger Intensität vermochte der Zusatz des 33-fachen Aequivalents den Tod durch Tetanustoxin nicht hintanzuhalten. Erst nach dem Zusatz des 67-fachen Aequivalents blieb das Leben erhalten. Diese Resultate wurden durch die Versuche Hubers (22) bestätigt, der weiterhin fand, daß die hämolytischen bezw. antihämolytischen Eigenschaften des Tetanustoxins und Antitoxins durch Exposition im Licht ähnlich beeinflußt werden, wie die rein toxischen bezw. antitoxischen Eigenschaften. Durch Zusatz photodynamischer Stoffe wurde auch hier die Wirksamkeit bedeutend abgeschwächt.

Jacobson (23) machte auf Veranlassung von v. Tappeiner Untersuchungen über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Flimmerepithel aus der Rachenschleimhaut des Frosches. Als photodynamische Stoffe wendete er Eosin, Harmalin, Chinolinrot, Aeskulin an, von Nicht-

fluoreszenten Säurefuchsin. Jacobson fand, daß das Licht die Giftwirkung fluoreszierender Stoffe auf Flimmerepithel steigert, daß nichtfluoreszierende giftige Stoffe keine gesteigerte Wirkung im Licht haben, daß nicht giftige, fluoreszierende Körper im Licht ebenso auf die Flimmerbewegung wirken wie im Dunkeln.

Die Wirkung photodynamischer Substanzen auf weiße Blutkörperchen war nach Salvendi (24) folgende: Die Leukocyten des Frosches wie auch die Leukocyten und Lymphocyten der Warmblüter erleiden durch die photodynamischen Substanzen im Licht eine Schädigung. Dieselbe tritt bei den weißen Blutkörperchen analog wie beim Flimmerepithel viel langsamer ein als bei Paramäcien. Bei Lymphocyten ist die Wirkung eine viel weitgehendere als bei den Leukocyten.

Sacharoff und Sachs (25), sowie Pfeiffer (26) fanden, daß rote Blutkörperchen durch Eosin-Lichtwirkung destruiert werden.

Eine sehr interessante Arbeit auf dem Gebiete der photodynamischen Erscheinungen ist die von G. Busck (27) über die Eiweißverbindungen photobiologischer Sensibilisatoren (photodynamischer Stoffe). Die Resultate seiner zahlreichen Untersuchungen sind:

Rote Blutkörperchen werden zerstört, wenn man sie mit intensivem Licht belichtet, das reich an kurzwelligen Strahlen ist. Der für Paramäcien giftige Stoff (Alexin), der in gewöhnlichem Blutserum enthalten ist, wird vernichtet, wenn er der Einwirkung ultravioletten Lichts ausgesetzt wird. Er läßt sich außerdem gegenüber mehr langwelligen Strahlen sensibilisieren. Ein Zusatz verschiedener photodynamischer Substanzen (Fluoresceinderivate, dichloranthracendisulfosaures Natrium u. s. w.) zum Blut warmblütiger Tiere zieht folgende Veränderungen der Eigenschaften des Blutes und der betreffenden photodynamischen Stoffe nach sich: Die Koagulationsfähigkeit des Blutes wird aufgehoben bezw. herabgesetzt, gleichviel, ob die Hinzusetzung in corpore oder in vitro geschieht. Die Alexinwirkung des Serums gegenüber Paramäcien wird aufgehoben bezw. herabgesetzt, selbst wenn die Präparate gegen die Einwirkung des Lichts geschützt werden. Die Toxizität der sensibilisierenden Stoffe wird aufgehoben bezw. herabgesetzt. Die spezifische Wirkung der sensibilisierenden Stoffe wird sowohl gegenüber Mikroorganismen und tierischen Gewebezellen, wie auch gegenüber Fermenten, Toxinen und Alexinen aufgehoben bezw. herabgesetzt. In Versuchen mit cellulären Reagentien tritt die Herabsetzung bedeutend kräftiger hervor als in Versuchen mit Lösungen nicht organisierter Stoffe. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Sensibilisatoren werden verändert. Seren verschiedener Tiere besitzen eine ungleich starke Wirkung. Die Wirkung ist am stärksten, je geringer die Alkaleszenz des betreffenden Serums ist, und durch künstliche Veränderung derselben — in vivo oder in vitro — ist man imstande, die Versuchsresultate in der angegebenen Richtung zu beeinflussen. Die Veränderungen der Eigentümlichkeiten der sensibilisierenden Stoffe sind nicht auf kolloide Eigenschaften des Serums als solche und auch nicht auf dessen amphotere Reaktion zurückzuführen; denn sie lassen sich nicht durch Zusatz von Leim, Gummi arabicum, Stärke, Pepton, oder Theobromin und Glykokoll hervorrufen. Hühnereiweiß verhält sich dagegen ähnlich wie Serum, wenn auch dessen Wirkungen bedeutend ausgeprägter sind. Die Ursache dieser Veränderungen ist darin zu suchen, daß die betreffenden Sensibilisatoren mit den Eiweißstoffen des Serums Verbindungen eingehen mit ganz anderen Eigenschaften als denen der beiden Komponenten. Diese

Verbindungen zwischen Serumalbumin und Farbsäuren zeichnen sich durch folgende Reaktion aus: Sie sind löslich in Serum sowohl bei alkalischer Reaktion wie bei neutraler und saurer Reaktion, sie sind außerdem außerordentlich schwer löslich in Wasser, jedoch löslich in Alkali und in dünner Salzsäure. Sie werden von starker HCl gespalten. Sie werden durch Entwässerung mit schwefelsaurem Ammoniak aus ihren alkalischen Lösungen gefällt. Durch Kochen werden sie nicht gefällt.

Die Ursache, daß sich eine wirksame phototherapeutische Behandlung blutparasitärer Krankheiten mit den photodynamischen Stoffen nicht durchführen läßt, hat seinen Grund nach den Untersuchungen von Busck (28) darin, daß ein Teil dieser Stoffe aus ihren wässerigen Lösungen durch Serumhinzusetzung gefällt wird. Andere werden im Organismus zu Leukoverbindungen reduziert, die keine photodynamischen (sensibilisierenden) Eigenschaften besitzen und schließlich gehen eine Reihe der am stärksten wirkenden Sensibilisatoren direkte Verbindungen mit den Eiweißstoffen des Serums ein. Die sensibilisierende Fähigkeit wird hierdurch so stark herabgesetzt, daß man die Farbstoffe zur Erzielung des gewünschten Resultats im Ueberschuß injizieren muß, wodurch man Dosen erhält, die sich den toxischen nähern. Hierzu kommt, daß die intravenöse Injektion dieser Farbstoffe keine reelle Gewebefärbung zur Folge hat, da die Stoffe nur äußerst langsam in die normalen Gewebezellen hineindiffundieren, während sie anderseits schnell, teils mit den Faeces, teils durch die Nieren ausgeschieden werden. Die Diffusionsgeschwindigkeit variiert mit der Alkaleszenz des Blutes. Nicht nur bei Untersuchungen über Totalsensibilisierung, sondern auch z. B. bei chromotherapeutischen Versuchen (die Anwendung von „Blutdesinfizientia") muß man mit den oben erwähnten Eiweißverbindungen der Anilinfarbstoffe und deren relativen Nichtgiftigkeit gegenüber Mikroorganismen rechnen. Die günstigen Resultate der Chromotherapie sind wahrscheinlich einer die Phagocytose begünstigenden, entwickelungshemmenden Einwirkung des betreffenden Farbstoffes auf die Mikroorganismen zuzuschreiben.

Phototherapeutische Versuche, die von Dreyer (29), v. Tappeiner (30), Jesionek (31), Busck (32), Neisser (33), Halberstädter (34), Raab (35) ausgeführt wurden, hatten aus den obigen von Busck und v. Tappeiner experimentell festgestellten Gründen negative Resultate.

Was die Bedingungen betrifft, unter denen die photodynamische Erscheinung beobachtet werden kann, so ist darüber folgendes zu sagen:

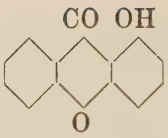
Eine Dunkelwirkung der fluoreszierenden Stoffe, welche mit der photodynamischen Erscheinung Beziehung hat, ist nach den Versuchen Jodlbauers (36) mit Jodkalium, mit Diastase und Ricin nicht nachzuweisen.

Ueber den Ablauf der photodynamischen Erscheinung bei alkalischer, neutraler und saurer Reaktion machte R. Dax (37) Untersuchungen und kommt zu dem Ergebnis, daß die photodynamische Erscheinung im wesentlichen unabhängig von der Reaktion verläuft. Ihre Intensität war insbesondere in alkalischer Flüssigkeit nicht größer als in neutraler oder saurer, wie es zu erwarten wäre, wenn zwischen ihr und der unter Säurebildung einhergehenden Zersetzung der angewandten fluoreszierenden Stoffe im Lichte ein ursächlicher Zusammenhang bestände. Die Versuche über die Beziehung der photodynamischen Wirkung der Stoffe der Fluoresceinreihe zu ihrer Fluoreszenzhelligkeit und ihrer Lichtempfind-

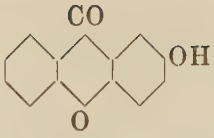
lichkeit, die von v. Tappeiner (38) ausgeführt wurden, ergaben, daß die photodynamische Wirkung der fluoreszierenden Stoffe in wässeriger Lösung unabhängig ist von der Zersetzung im Licht, daß man also die photodynamische Erscheinung zu den katalytischen Vorgängen zählen und die fluoreszierenden Stoffe als Lichtkatalysatoren bezeichnen kann. Das Sensibilisierungsvermögen der Fluoresceine steigt von den Stoffen größter Fluoreszenzhelligkeit zu jenen geringster. Dieses Ansteigen ist jedoch kein gleichmäßiges und geht mit dem Absinken der Fluoreszenzhelligkeit nicht parallel. Die Versuche über die Abhängigkeit der Wirkung der fluoreszierenden Stoffe von ihrer Konzentration, die Jodlbauer und v. Tappeiner (39) ausführten, ergaben für alle Fluoresceine das Gemeinsame, daß die Wirkung mit abnehmender Konzentration zunächst zu einem Maximum, das zwischen Konzentration 1 : 1000 normal und 1 : 10000 normal liegt, ansteigt und dann abfällt. Die Lage des Maximums bei Fluorescein ist nahe bei Konzentration 1 : 2000 normal. Methylenblau verhält sich dem Fluorescein analog, indem seine Wirkung mit steigender Konzentration durch ein Maximum geht, das in der Nähe 1 : 2000 molekular liegt. Die Wirkung der Dichloranthracendisulfosäure nimmt mit steigender Konzentration zunächst langsam, dann rascher fortwährend zu, so daß das Maximum der Wirkung mit dem Maximum der Konzentration zusammenfällt.

Zur Erklärung der photodynamischen Erscheinung wurden vielerlei Betrachtungen angestellt:

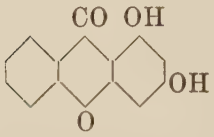
v. Tappeiner und Jodlbauer (40) kommen zu folgenden Sätzen: Die Wirkung beruht auf Absorption bestimmter Strahlen, denn sie bleibt aus, wenn die Strahlen, welche die photodynamische Substanz absorbiert, vorher abfiltriert werden, kommt hiergegen in nahezu unverminderter Stärke zum Ausdruck, wenn die Strahlen zugelassen, alle anderen abgehalten werden. Die Erscheinung ist jedoch kein einfacher Absorptionsvorgang. Zahlreiche Farbstoffe, welche sich durch Absorption in verschiedenen Teilen des Spektrums auszeichnen, haben keine photodynamische Wirkung, weder auf Paramäcien noch auf Enzyme. Versuche mit dem Nitrosofarbstoff Naphtolgrün B, mit Pikrinsäure, mit den Azofarbstoffen Viktoriaviolett 4BS, Azobordeaux (By), Azofuchsin S (By), Benzopurpurin 4B (By), Azoblau (By), Diamingrün G, mit dem Diphenylmethanfarbstoff Auramin, mit den Triphenylmethanfarbstoffen Methylviolett (Gemenge von Penta- und Hexamethylpararosanilin), Kristallviolett (salzsaures Hexamethylpararosanilin), salzsaures Pararosanilin (Parafuchsin), salzsaures Rosanilin (Fuchsin), Pararosolsäure (Aurin), Rosolsäure, Malachitgrün, mit indigodisulfosaurem Natrium, Hämatoxylin. Da die Erscheinung bisher ausnahmslos nur an Substanzen beobachtet wurde, die auch die Eigenschaft zu fluoreszieren besitzen und die Untersuchung sich über eine große Anzahl von fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Stoffen erstreckt, so ist die Wahrscheinlichkeit, daß die photodynamische Wirkung mit Fluoreszenz in Zusammenhang steht, eine große. Ist nun das ausgesandte Fluoreszenzlicht das Wirksame? Die Versuche ergaben, daß dies nicht der Fall ist. Ein weiterer Beleg ist der bereits erwähnte Umstand, daß in einer Gruppe chemisch verwandter fluoreszierender Stoffe in der Regel die photodynamische Wirkung um so größer, je geringer die Fluoreszenzhelligkeit ist. Neben der Fluoresceinreihe, die bereits nach dieser Richtung hin erwähnt worden ist, zeigt sich das in typischer Weise in der Xanthongruppe:



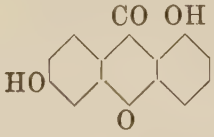
1-Oxyxanthon
Alkalische Lösung gelblich, keine Fluoreszenz,
keine Photodynamie.



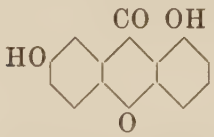
2-Oxyxanthon
Alkalische Lösung gelb, sehr schwach grüne Fluoreszenz,
sehr deutliche Photodynamie.



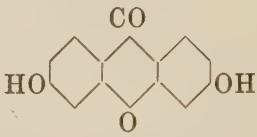
1-3-Dioxyxanthon
Alkalische Lösung gelblich, ohne Fluoreszenz und ohne Photodynamie.
Letale Konzentration 1 : 20000.



1-6-Dioxyxanthon
Alkalilösung gelblich, violette Fluoreszenz, schwache Photodynamie.
Letale Konzentration 1 : 80000.



1-7-Dioxyxanthon
Alkalilösung grünlichgelb, ohne Fluoreszenz und ohne Photodynamie.
Letale Konzentration 1 : 150000.



3-6-Dioxyxanthon
Alkalilösung schwach gelb, starke violette Fluoreszenz.
Sehr deutliche Photodynamie, indes schwächer als 2-Oxyxanthon.
Letale Konzentration 1 : 2000.

Bei ein und derselben Substanz nimmt die photodynamische Wirkung zu bezw. ab, im selben Sinne wie die Fluoreszenz. Die Annahme, daß ein Teil der absorbierten strahlenden Energie zu einer chemischen Zersetzung der photodynamischen Substanz führt und auf diese die Wirkung zurückzuführen ist, wird durch den Versuch widerlegt, daß Lösungen von Fluorescein, Eosin, Erythrosin, Akridin, Phosphin, Chinolinrot, Dichloranthracendisulfosäure u. s. w. längere Zeit dem Licht ausgesetzt und einige Zeit nachher erst im Dunkeln mit Paramäcien oder Enzymen zusammengebracht, sich nicht anders als im Dunkeln bereitete Lösungen verhalten.

Solange die analoge Einwirkung auf Toxine und Enzyme noch nicht bekannt war und nur mit Paramäcien Versuche gemacht worden waren, war die Erklärung möglich, daß ein Teil der absorbierten Energie zur Erhöhung der Giftigkeit der photodynamischen Substanz als solcher verwendet werde. Jedoch sprach auch gegen diese Erklärung der Befund, daß das schöne violettblau fluoreszierende Natronsalz der Dichloranthracendisulfosäure im Dunkel ganz ungiftig ist, im Lichte sich aber als sehr stark photodynamisch erwies (eine Lösung von 1 : 1000000 tötete im Licht noch nach 24 Stunden). v. Tappeiner und Jodlbauer (41) kommen, nachdem sie photodynamische Erscheinung und Sensibilisation nicht für identisch erklärt haben, zu folgenden Schlußsätzen: Es ist offenbar eine ganz neue Wirkung, welche beim Zusatz des Eosins bezw. anderer analoger Stoffe zur Geltung kommt. Ist die photodynamische Substanz ungiftig, so tritt eine Schädigung der Organismen und Gewebszellen erst im Lichte auf; ist sie giftig, so addiert sich die photody-

namische Wirkung zur Giftwirkung. Der Vorschlag, die Stoffe mit einem Namen zu bezeichnen: photodynamische, d. h. im Licht bezw. bei Bestrahlung wirkend, ist daher durchaus gerechtfertigt. Er präjudiziert nichts und kann fallen gelassen werden, wenn der weitere Verlauf der Untersuchung die unzweifelhafte Berechtigung gibt, von Fluoreszenzwirkung bezw. Fluoreszenztherapie zu sprechen.

Sehr eingehende Untersuchungen wurden darüber angestellt, wie weit das Vorhandensein von Sauerstoff als ein unbedingter Faktor bei der photodynamischen Erscheinung angesehen werden muß. Bereits Raab (42) hat darüber Untersuchungen angestellt. Ledoux-Lebard (43) verdankt man in dieser Beziehung einige sehr interessante Versuche:

Er stellte sich eine Eosinlösung in der Verdünnung 1 : 1000 her. Einen Teil setzt er dem Tageslicht aus, der andere Teil wird im Dunkelzimmer behalten. Nach einer Stunde bringt er die belichtete Lösung in das Dunkelzimmer, setzt dieser, wie der unbelichteten Lösung, eine gleiche Anzahl Paramäcien zu und findet, daß in der belichteten Lösung die Tiere schneller zu Grunde gehen als in der unbelichteten. Weiterhin konstatierte er, „que les paramécies ajoutés, après l'éclairement, meurent d'autant plus vite que la lumière était plus intense". Ledoux-Lebard macht auf einen Umstand aufmerksam, der nach v. Tappeiners (44) Meinung vielleicht der erste Ansatz zu einer Erklärung der photodynamischen Wirkung auf chemischem Wege enthält. Ledoux-Lebard fand, daß offenbar der Sauerstoff bei der interessanten Erscheinung eine wichtige Rolle spiele. „Le contact de la solution avec l'air pur une large surface favorise l'apparition du pouvoir toxique. Celui-ci est faible lorsque la solution est contenue dans un tube fermé, effilé et rempli de liquide jusque dans l'effilure. Le vide incomplet obtenu à l'aide de la trompe diminue également la production de substance toxique, sous l'influence de la lumière."

Der Erklärung der photodynamischen Erscheinung durch die Autoxydationstheorie von Bach und Engler (45), die Straub (46) zu seinen Versuchen heranzieht, können v. Tappeiner und Jodlbauer (47) nicht beistimmen. Straub will einen experimentellen Beweis in dem Phänomen Ledoux-Lebards finden, was jedoch in sehr exakter Weise von v. Tappeiner und Jodlbauer widerlegt wird. Bei der Zersetzung des Eosins durch Bleichung bildet sich Säure, die auf die gegen Säuren äußerst empfindlichen Paramäcien einwirkt; denn neutralisiert man eine vorbelichtete Lösung von Eosin, Erythrosin oder dichloranthracendisulfosaurem Natrium genau, so verschwindet die Ledoux-Lebardsche Erscheinung vollständig. Da die Paramäcienkulturen in geringem Grade alkalisch wirken, so neutralisieren sie, je mehr von ihnen vorhanden sind, die gebildete Säure mehr oder weniger. Damit erklärt sich die von Ledoux-Lebard beobachtete Erscheinung, daß Paramäcien in vorbelichteter Eosinlösung um so länger am Leben bleiben, je mehr von ihrer Kultur der Lösung zugefügt wird. Der chemische Nachweis des Peroxyds mißlang bei den Versuchen von v. Tappeiner und Jodlbauer (48).

v. Tappeiner und Jodlbauer machten weitere Versuche über die Beteiligung des Sauerstoffes bei der photodynamischen Erscheinung und zwar mit einer fakultativ anaëroben Bakterienart, Bacterium vulgare (Proteus vulgaris Hauser). Sie fanden, daß das Wachstum der im Dunkel aufbewahrten Kultur, sowie der belichteten luftleeren Kultur nicht sistiert war, während die belichteten lufthaltigen Röhren

steril waren. Die Versuche mit Enzymen (Invertin, Diastase) und dem Toxin Ricin ergaben dasselbe. Fluoreszierende Stoffe vernichteten die Wirkungen von Enzymen und Toxinen nur bei Gegenwart von Sauerstoff, wenn auch die zur Schädigung nötigen Mengen von Sauerstoff nur geringe zu sein brauchen. Sauerstoff unter erhöhtem Druck und Atmosphärendruck verhielt sich in seinem Einfluß auf die Photodynamie gleich. Die Versuche, das aufgetretene Oxydationsprodukt bei Diastase (Kohlensäure) festzustellen, ergaben, daß die Bildung von Kohlensäure selbst bei Anwendung größerer Mengen des Enzyms äußerst gering und nicht mit Sicherheit bestimmbar ist.

Die Versuche mit sog. Ozonreagentien zum Nachweis aktiven Sauerstoffs ergaben Schwärzung von metallischem Silber durch Bildung von Silberoxyd, Bläuung von Guajakharz in Chlorhydratlösung, Bläuung der Tetrabase von Arnold und Mentzel (49), positiven Ausfall der Indophenolreaktion, Bläuung von Wursters Tetrapapier. Arsenige Säure wurde zu Arsensäure, Indigo zu Isatin, Benzylalkohol zu Benzoesäure, Salicylaldehyd zu Salicylsäure, Pyrogallol unter CO_2-Entwickelung oxydiert. Edlefsen (50) fand, daß durch Resorufin, Eosin und Chinin im Licht schwefelsaures Eisenoxydul rasch zu Oxyd, und β-Naphtol zu β-Naphtochinon oxydiert werden, Vorgänge, die als Sensibilisierung aufgefaßt werden können. v. Tappeiner und Jodlbauer (51) fanden die Jodkaliumreaktion nur fluoreszierenden Stoffen eigen. Allen nicht fluoreszierenden Stoffen fehlt sie. Die Jodkaliumreaktion geht jedoch mit der photodynamischen Wirkung nicht parallel, da z. B. die photodynamisch unwirksame Fluorindisulfosäure und das ebenfalls photodynamisch unwirksame Aeskulin die Reaktion sehr intensiv geben, während die photodynamisch stark wirkenden Stoffe Phenosafranin, Azokarmin, γ-Phenylchinaldin, α-Naphtoltrisulfosäure, β-Naphtylamindisulfosäure, Naphtionsäure auf Jodkalium nur sehr schwach oder gar nicht wirken.

Das Ergebnis, daß die fluoreszierenden Stoffe bei Abwesenheit von Sauerstoff auf die Edersche (52) Mercuri-Oxalat-Reaktion befördernd einwirken, veranlaßt v. Tappeiner und Jodlbauer (53), anschließend an die Theorie Nernsts, zu erklären, daß Ionenbildung, die durch die absorbierte Lichtenergie hervorgerufen ist, den Wirkungen der fluoreszierenden Substanzen zu Grunde liegt.

Die Frage, ob die photodynamische Erscheinung mit der von H. W. Vogel (54) an Bromsilberplatten entdeckten optischen Sensibilisierung identisch ist, hat eine Reihe von Kontroversen hervorgerufen.

H. W. Vogel wies im Jahre 1873 nach, daß bei der Lichtempfindlichkeit der Silbersalze nicht allein ihre eigene Absorption, sondern auch die Absorption beigemengter Substanzen eine Rolle spielen kann. Diese Substanzen, durch deren Beimengung man die Platten gegenüber allen Strahlen des Spektrums empfindlich machen kann, nennt man Sensibilisatoren, den Vorgang optische Sensibilisierung.

Man fand, daß sehr viele optische Sensibilisatoren die Eigenschaft zu fluoreszieren haben, jedoch nicht alle. Die Erscheinung der Photodynamie wurde bis jetzt jedoch nur an fluoreszierenden Substanzen beobachtet. Aus diesem Grunde verneinten v. Tappeiner und Jodlbauer (55) die Identität der beiden Vorgänge. Faßt man, wie v. Tappeiner ausführt, jedoch die Sensibilisierung als eine Steigerung jedes Prozesses auf, der auch durch Licht allein bewirkt wird, so kann die Frage nur dann entschieden werden, wenn der Endeffekt bei der photodynamischen Erscheinung wie bei der bloßen Lichtwirkung unter denselben

Bedingungen erfolgt. v. Tappeiner und Jodlbauer (56) wiesen nach, daß Enzyme durch Licht nur bei Gegenwart von Sauerstoff merkbar geschädigt werden, also unter denselben Bedingungen wie bei Anwesenheit von fluoreszierenden Substanzen. Die photodynamischen Stoffe können in diesem Falle als Lichtkatalysatoren bezeichnet und der Vorgang kann als Sensibilisierung im weiteren Sinne des Wortes aufgefaßt werden.

Ob Sauerstoff auch bei der Abtötung von Bakterien durch Licht vorhanden sein muß, ist bis jetzt noch nicht entschieden. v. Bie (57) verneint es.

Eigene Versuche.

1. Versuche mit Fluorescein.

Bei diesen Versuchen war es mir in erster Linie darum zu tun, ein chemisch reines Präparat zu erlangen. Die käuflichen Fluoresceinpräparate sind zum großen Teil nicht rein, weshalb ich das Fluorescein selbst herstellte:

Zur Herstellung von rohem Fluorescein wurde folgender Weg eingeschlagen. 20 g zerkleinertes Phtalsäureanhydrid wurden mit 28 g zerkleinertem Resorcin gut miteinander vermengt und in einem Kochkolben im Oelbad auf 180° erhitzt. Sobald die Masse geschmolzen war, wurden in kleinen Portionen 9 g pulverisiertes Chlorzink eingetragen. Nach dem Zusatz des Chlorzinks wurde die Temperatur so lange auf 210° gehalten, bis die ganze Masse fest geworden war. Durch Zerschlagen des Kolbens wurde die rötliche Schmelze entfernt und im Mörser fein zerrieben. Die pulverisierte Masse wurde mit 250 ccm Wasser, dem 12 ccm konzentrierte Salzsäure zugegeben worden waren, 15 Minuten lang gekocht. Das Fluorescein wurde sodann mit Alkohol gewaschen.

Im Gesamten wurden auf diese Weise zu den weiteren Versuchen 300 g Fluorescein hergestellt. Zur Reinigung des Fluoresceins wurde dasselbe zunächst in Diacetylfluorescein auf folgende Weise umgewandelt:

20 g Fluorescein wurden mit 70 g fraktioniert destilliertem Essigsäureanhydrid am Rückflußkühler 2 Stunden in gelindem Sieden gehalten. Nach dieser Zeit war vollständige Lösung eingetreten und eine Probe mit Alkohol versetzt, schied gelbe Kristalle ab, die in verdünntem Ammoniak unlöslich waren. Der Kolbeninhalt wurde sodann in eine Schale gegossen und allmählich mit 50 g Alkohol versetzt. Die Acetylverbindung schied sich in gelben Blättchen ab.

Zur Reinigung des Diacetylfluoresceins empfiehlt Baeyer (58) die Lösung in Eisessig, welche sodann mit einem mehrfachen Volumen Alkohol versetzt werden soll. Auf diese Weise konnte jedoch kein farbloses Produkt erhalten werden.

Um einen anderen Weg zur Reinigung zu finden, wurden Löslichkeitsversuche angestellt, deren Ergebnis folgendes ist (verwendet wurde aber hierbei das noch gelb gefärbte Diacetylfluorescein, das weiße Diacetylfluorescein verhielt sich gegenüber den Lösungsmitteln anders):

Chloroform:	Leicht löslich auch in der Kälte
Aceton:	Leicht löslich beim Kochen
	Schwer löslich in der Kälte
Benzol:	Leicht löslich beim Kochen
	Leicht löslich in der Kälte
Petroläther:	Schwer löslich beim Kochen
	Schwer löslich in der Kälte

Essigester:	Leicht löslich beim Kochen
	Leicht löslich in der Kälte
Eisessig:	Leicht löslich beim Kochen
	Mäßig löslich in der Kälte

Weitere Reinigungsversuche wurden mit Benzol und Aceton gemacht. Da das Diacetylfluorescein immer noch schwach gelblich gefärbt war, so wurde mehrfach mit Tierkohle aufgekocht. Im ganzen wurde etwa 12mal umkristallisiert, bis ein annähernd farbloses Produkt erhalten wurde. Um die Reinheit des erhaltenen Diacetylfluoresceins zu prüfen, wurden einige Analysen ausgeführt, die folgendes Ergebnis hatten:

Nach der 10. Kristallisation:

	Gefunden	Berechnet
C	69,18 Proz.	69,23 Proz.
H	5,19 „	3,85 „

Nach der 12. Kristallisation:

	Gefunden	Berechnet
C	69,53 Proz.	69,23 Proz.
H	4,46 „	3,85 „

Eine Probe, die nur aus Benzol 8mal umkristallisiert worden war, ergab folgendes Analysenresultat:

	Gefunden	Berechnet
C	69,93 Proz.	69,23 Proz.
H	5,91 „	3,85 „

Bei der näheren Untersuchung namentlich gegenüber Alkalien zeigte sich, daß das Diacetylfluorescein teilweise verseift war. In Alkalien, in denen es nach Baeyer unlöslich sein soll, löste es sich in der Kälte teilweise mit Fluoreszenz auf. Auch der Gedanke lag nahe, daß nicht alles Fluorescein in die Diacetylverbindung übergegangen war. Es wurde deshalb ein bereits mit Essigsäureanhydrid behandelter Teil nochmals mit derselben Menge von Essigsäureanhydrid am Rückflußkühler behandelt.

Das Analysenresultat des so erhaltenen farblosen Materials war folgendes:

	Gefunden	Berechnet
C	70,12 Proz.	69,23 Proz.
H	4,73 „	3,85 „

Das Produkt war wiederum teilweise in Alkalien mit Fluoreszenz löslich, Schmelzpunkt 202°.

Da die Diacetylverbindung nur zwecks Reinerhaltung des Fluoresceins dargestellt worden war, so konnte eine teilweise Verseifung bei der weiteren Behandlung nicht hinderlich sein. (Eine unvollständige Acetylierung war ja nach 2maligem Behandeln mit Essigsäureanhydrid ausgeschlossen.)

Im ganzen wurden 150 g farbloses Diacetylfluorescein hergestellt.

Zur Verseifung wurden folgende Versuche angestellt:

2 g KOH wurden in 10 g Alkohol absolut. gelöst. In die Lösung wurden 2 g Substanz eingetragen und das Ganze auf dem Wasserbad etwa eine Viertelstunde erhitzt. Zu der Masse wurden zwecks vollständiger Lösung noch 50—60 g Wasser gebracht. Sodann wurden zur Ausfällung des Fluoresceins verdünnte Essigsäure zugesetzt. Das Fluorescein fiel als harzige Masse aus, um bei weiterem Stehen allmählich kristallinisch zu werden. Das abgesaugte Produkt wurde mit 5 g Alkohol absol. auf dem Wasserbad erhitzt. Die Quantität des Alkohols mußte

auf 50 g erhöht werden, da erst in dieser Menge Lösung des Fluoresceins eintrat (ein kleiner unlöslicher Rückstand blieb zurück). Der Alkohol wurde durch Abdestillieren um das 10-fache Volumen vermindert und die Kristallisation eingeleitet.

Das so erhaltene Produkt hinterließ auf dem Platinblech keinen Rückstand. Der Schmelzpunkt konnte wegen der Zersetzung des Körpers nicht bestimmt werden. Beim Versuch, eine weitere Reinigung durch Lösen in Eisessig auszuführen, erwies sich das Fluorescein als schwer löslich (Bernstein bezeichnet das Fluorescein als leicht löslich in Eisessig). Das durch längeres Kochen mit überschüssigem Eisessig gelöste Fluorescein konnte durch Zusatz von Wasser leicht wieder in harziger Form ausgefällt werden. Bei nochmaliger Lösung in verdünntem Eisessig ging es allmählich in die rote (?kristallinische) Form über.

Da diese Art der Verseifung zu umständlich war, um sie auf die ganze Menge des Diacetylfluoresceins anzuwenden, so wurden noch weitere Versuche angestellt:

50 g Diacetylfluorescein wurden mit 200 g Alkohol absol. und 20 Tropfen Salzsäure versetzt. Sodann wurden 2 g Natriumacetat zugesetzt. Das Ganze wurde auf dem Wasserbad gekocht, bis vollständige Lösung eingetreten war. Die auskristallisierte Masse wurde mit Wasser aufgekocht, um das Natriumacetat zu entfernen.

Der einfachste Weg zur Verseifung des Diacetylfluoresceins und zur Gewinnung reinen Fluoresceins war folgender:

2 g Diacetylfluorescein wurden mit 20 g Alkohol absol. und 6 Tropfen konz. Salzsäure auf dem Wasserbad bis zur vollständigen Lösung behandelt, was etwa $^3/_4$ Stunden beanspruchte. In die Lösung wurden 150 g Wasser gebracht und das Ganze nochmals $^3/_4$ Stunden auf dem Wasserbad gelassen. Das Fluorescein schied sich allmählich in schönen dunkelroten Kristallen ab, die abgesaugt und mit Wasser zur Entfernung der Salzsäure gewaschen wurden.

Wurde die Lösung in Wasser gegossen, was bei einer 2. Probe getan wurde, so schied sich das Fluorescein in fein verteiltem gelben Zustand aus. Bei längerem Verweilen auf dem Wasserbad wurde das Fluorescein rot gefärbt. Die Färbung war jedoch eine hellere, als bei dem auf erstem Wege erhaltenen Produkt.

Die Analyse ergab folgendes Resultat:

	Gefunden	Berechnet
C	71,97 Proz.	72, 2 Proz.
H	3,94 „	3,62 „

Die Löslichkeitsverhältnisse waren folgende:

Wasser:	Mäßig löslich in Kälte
Chloroform:	Schwer löslich in Kälte
	Mäßig löslich in Wärme
Aceton:	Leicht löslich in Kälte
	Leicht löslich in Wärme
Benzol:	Schwer löslich in Kälte
	Mäßig löslich in Wärme
Eisessig:	Mäßig löslich in Kälte
	Leicht löslich in Wärme
Aether:	Schwer löslich in Kälte
	Mäßig löslich in Wärme
Alkohol:	Leicht löslich in Kälte und Wärme

Die Lösung in Alkohol und Aether ist gelbrot, alle anderen gelblich, teilweise mit starker Fluoreszenz gefärbt. Scheidet sich das Fluorescein aus den heißen konzentrierten Lösungen in Alkohol und Aceton aus,

so sind die Kristallkörner dunkelrot gefärbt. Fällt man das Fluorescein aus alkalischer Lösung mittelst Säuren, so bildet es einen gelben Niederschlag, der beim Erwärmen und beim Trocknen gelbrot wird. Das Fluorescein ist nicht flüchtig. Beim Erhitzen bräunt es sich bei 290° und zersetzt sich bei weiterer Temperatursteigerung vollständig.

In Alkalien ist das Fluorescein leicht löslich. Sind die Alkalien konzentriert, so ist die Lösung dunkelrot ohne Fluoreszenz. Beim Verdünnen wird sie in durchfallendem Licht gelb und fluoresziert gelbgrün. Die Fluoreszenz verschwindet auf Zusatz der Säure. Alkoholisches Ammoniak fällt aus der ätherischen Lösung des Fluoresceins ein Ammoniumsalz in rotgelben Flocken, das jedoch sehr unbeständig ist.

Dieses nunmehr chemisch reine Fluorescein benützte ich zu den bakteriologischen Versuchen.

Es wurden folgende Verdünnungen hergestellt: 1:100 (mit $^1/_4$ Norm.-Natronlauge), von dieser ausgehend durch Verdünnung mit sterilisiertem destilliertem Wasser 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000, 1:60000, 1:100000, 1:500000, 1:1000000.

Als Nährböden benützte ich Agar-Agar, Gelatine und Bouillon. Agar-Agar-Nährboden hatte ich auf folgende Weise hergestellt:

Von Sehnen, Knochen und Fett befreites Rindfleisch wurde in der Hackmaschine zerkleinert, 1 Pfund abgewogen, mit 1 l Wasser übergossen und bis zum anderen Tage stehen gelassen, abgepreßt mittelst einer Fleischpresse, filtriert durch ein Papierfilter, ergänzt auf ein Liter. Sodann wurden 15 g Stangenagar zugesetzt, der vorher in kleine Stückchen zerschnitten worden war. Nach einer Stunde wurde der Agar in den Autoklaven gebracht und verblieb dort bis zur Lösung (70 Min.). Sodann wurden 10 g Pepton sicc. Witte und 5 g Kochsalz zugesetzt. Die Neutralisation erfolgte mit Normalnatronlauge. Die Masse wurde 50 Min. in den Autoklaven eingesetzt, sodann filtriert. Das Filtrat wurde in sehr dünne sterilisierte Reagenzgläser eingefüllt. In jedes Reagenzglas wurden genau 5 ccm des Nährbodens gebracht.

Der Gelatinenährboden war auf folgende Weise hergestellt worden.

Zu 500 ccm Fleischwasser wurden 50 g Gelatinetafeln gegeben und im Wasserbad auf 55° erwärmt. Nach der Lösung wurden 5 g Pepton und 2,5 g Kochsalz zugesetzt und durch Erwärmen zur Lösung gebracht. Der Nährboden wurde neutralisiert mit Normalnatronlauge. Nach dem Abkühlen auf 50° wurde das Weiße von einem Hühnerei zugegeben. Nach viertelstündigem Stehen im Dampftopf (vom Ausströmen des Dampfes an gerechnet) wurde im Heißwassertrichter filtriert und das Filtrat in Mengen von genau 5 ccm in sehr dünne sterilisierte Reagenzgläser gebracht.

Zur Herstellung von Nährbouillon wurde 1 l Fleischwasser erwärmt und mit 10 g Pepton sicc. Witte, 5 g Kochsalz versetzt. Nach der Lösung wurde mit Normalnatronlauge neutralisiert. Nach $^3/_4$-stündigem Stehen im Dampftopf wurde durch ein angefeuchtetes doppeltes Faltenfilter filtriert. Von dem Filtrat wurden wiederum genau 5 ccm in sehr dünne sterilisierte Reagenzgläser gebracht.

Nach dem Füllen der Reagenzgläser wurden alle Gläser im Dampftopf sterilisiert.

Zu je 5 ccm der flüssig gemachten Nährböden wurden 1 ccm der Fluoresceinlösungen gebracht. Agar wurde schräg erstarren gelassen. Es wurden immer 3 Reagenzgläser mit einer und derselben Lösung behandelt.

A. Versuche mit Bacterium typhi.

Der hierzu verwendete Typhusstamm war aus dem Kot eines Typhuskranken gezüchtet worden. Es wurden zu den Versuchen stets frische 24 Stunden alte Typhuskulturen verwendet.

a) Versuche im Dunkeln.

1. Wachstum im Brutschrank. Prüfung der Toxizität des Fluoresceins.

Konzentration	Makroskopischer Befund
1:100	Nährboden stark fluoreszierend Nicht sichtbares Wachstum
1:1000 (0,5 ccm)	Nährboden stark fluoreszierend Gutes typisches Wachstum
1:2000	Nährboden stark fluoreszierend Gutes Wachstum
1:5000	Nährboden stark fluoreszierend Gutes Wachstum
1:10 000	Nährboden stark fluoreszierend Sehr gutes Wachstum
1:60 000	Nährboden schwach fluoreszierend Sehr gutes Wachstum
1:100 000	Nährboden sehr schwach fluoreszierend Sehr gutes Wachstum
1:500 000	Fluoreszenz des Nährbodens kaum sichtbar Sehr gutes Wachstum
1:1 000 000	Fluoreszenz kaum sichtbar Sehr gutes Wachstum

Kontrolle:

Auf allen 3 ungefärbten Röhrchen sehr gutes Wachstum.

Das Wachstum war von Konzentration 1:1000 an typisch. Der Metallglanz der Kulturen trat deutlich hervor. Die Kulturen zeigten in der Konzentration 1:1000 schwach gelbliche Färbung, was von der Aufnahme des Fluoresceins herrührte.

Mit allen Kulturen wurden Agglutinationsprüfungen vorgenommen. Das zu diesem Zweck verwendete Typhusserum war auf folgende Weise hergestellt worden:

Drei 24 Stunden alte Agarkulturen wurden abgeschwemmt und im Wasserbad 1 Stunde lang auf 65° gehalten. Die Abschwemmung wurde einem Kaninchen subkutan injiziert. Nach 10 Tagen erfolgte die Blutentnahme. Das Blut verblieb 24 Stunden im Eisschrank. Hernach wurde das klare Serum in Kapillarröhrchen eingefüllt.

Die Fluoresceinkulturen von Bact. typhi wurden mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Bis zur Konzentration 1:2000 fluoreszierten die Abschwemmungen schwach, bei den höheren Verdünnungen nicht mehr.

Die Serumverdünnung war bei den Versuchen 1:50.

Das Ergebnis der Agglutinationsprüfung war folgendes:

Konzentration	Mikroskopischer Befund
1:100	Sehr wenig Bakterien mit geringer Beweglichkeit Nach 25 Minuten beginnende Agglutination
1:1000	Sehr viele gut bewegliche Bakterien Nach 25 Minuten beginnende Agglutination
1:2000	Viele gut sich bewegende Bakterien Nach 25 Minuten beginnende Agglutination

Konzentration	Mikroskopischer Befund
1:5000	Zahlreiche gut sich bewegende Bakterien Nach 25 Minuten eingetretene vollständige Agglutination
1:10 000	Zahlreiche gut sich bewegende Bakterien Nach 25 Minuten eingetretene vollständige Agglutination
1:60 000	Zahlreiche gut sich bewegende Bakterien Nach 25 Minuten eingetretene vollständige Agglutination
1:100 000	Sehr viele gut sich bewegende Bakterien Nach 25 Minuten eingetretene vollständige Agglutination
1:500 000	Sehr viele gut sich bewegende Bakterien Nach 25 Minuten eingetretene vollständige Agglutination
1:1 000 000	Sehr viele gut sich bewegende Bakterien Nach 25 Minuten eingetretene vollständige Agglutination

Bei der Konzentration 1:1000 und 1:2000 war die vollständige Agglutination nach 35 Minuten eingetreten.

Bei den Kontrollpräparaten war die Agglutination in 25 Minuten vollständig eingetreten.

b) Versuche im Hellen und Dunkeln. Prüfung der photodynamischen Wirkung des Fluoresceinpräparates auf Bact. typhi.

Die Versuche wurden mit Agar-Agar-Nährboden, mit Gelatine und Nährbouillon ausgeführt.

1. Versuche mit Agar-Agar-Nährboden, der mit Fluorescein in verschiedenen Konzentrationen beschickt wurde.

Die Herstellung der Verdünnungen war dieselbe wie bei A a.

Die Ausführung der Versuche wurde in folgender Weise gehandhabt: Von der Typhuskultur, die auf Schrägagar 48 Stunden gezüchtet worden war, wurde ein Teil (gewöhnlich 3 Platinösen) in sterile Bouillon übertragen, die 12 Stunden in den Brutschrank gestellt wurde.

Nach dieser Zeit wurden von den mit Fluorescein beschickten Agarröhrchen im Dunkeln Petri-Schalen gegossen. Zu jeder Verdünnung wurden 6 Platten benützt. Nach dem Starrwerden dieser Platten wurden die Platten mit der Typhuskultur aus Bouillon beschickt und zwar auf die Weise, daß ein Tropfen der Kultur an einen sterilisierten Drigalski-Spatel gebracht und damit die Platte in ihrer ganzen Fläche infiziert wurde.

3 Platten wurden in schwarzes Papier eingewickelt und unter denselben Bedingungen aufbewahrt wie die anderen 3 Platten, die dem diffusen Tageslicht ausgesetzt wurden. Die Exposition war verschieden lang.

Dauer der Exposition 24 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1:1000	Mäßiges „	Gutes „
1:2000	Gutes „	„ „

In allen anderen Verdünnungen ließ sich kein Unterschied im Wachstum wahrnehmen.

Als Kontrollplatten dienten 3 Petri-Schalen, die, nichtgefärbt, auf dieselbe Weise wie oben mit Typhusbacillen beschickt worden waren.

Eine Hemmung des Wachstums nach 24-stündiger Exposition im diffusen Tageslicht ließ sich nicht wahrnehmen.

Dauer der Exposition 48 Stunden.

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1 : 1000	Sehr geringes Wachstum	Gutes „
1 : 2000	Geringes Wachstum	„ „
1 : 5000	Gutes Wachstum	„ „
1 : 10 000	„ „	„ „

In den weiteren Verdünnungen ließ sich kein Unterschied in dem Wachstum konstatieren.

Als Kontrollplatten hatten 3 Platten gedient, die mit ungefärbtem Agarnährboden beschickt worden waren. Zur Infektion wurde derselbe Stamm wie oben benützt.

Das Wachstum war folgendes:

Dauer der Exposition 48 Stunden. Gutes Wachstum auf allen 6 Platten.

Es ließ sich demnach ein, wenn auch sehr geringer Unterschied unter den Platten konstatieren. Die Verdünnungen 1:1000, 1:2000, die dem Licht ausgesetzt worden waren, hatten in mäßigem Grad wachstumshemmend gewirkt. Jedoch war die photodynamische Wirkung sehr gering.

Eine Abtötung der Typhuskulturen konnte in diffusem Tageslicht, selbst bei 4—6-tägiger Exposition, nicht erzielt werden, während dies im Sonnenlicht bereits bei 15-stündiger Exposition bemerkt wurde. Ein Unterschied in den Abtötungszeiten der Fluoresceinnährböden und der nicht gefärbten Nährböden konnte nicht bemerkt werden. Die Wirkung des Sonnenlichts war in beiden Fällen gleich intensiv.

2. Versuche mit Gelatinenährböden, die mit Fluorescein in verschiedener Konzentration beschickt worden waren.

Die Ausführung der Versuche war dieselbe wie bei Agarnährboden. Die Gelatine wurde ebenfalls in Petri-Schalen gegossen.

Die Fluoreszenz trat in den Gelatineröhrchen außerordentlich schön hervor.

Dauer der Exposition 24 Stunden.

(Eine Vorschaltung von Strahlenfiltern zur Ausschaltung von Wärmestrahlen war unnötig, da die Versuche nur in diffusem Tageslicht ausgeführt wurden.)

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1 : 1000	Mäßiges „	Mäßiges „
1 : 2000	„ „	Gutes „
1 : 5000	Gutes „	„ „

In allen anderen Verdünnungen ließ sich kein Unterschied im Wachstum wahrnehmen.

Auf den Kontrollplatten, die auf dieselbe Weise wie oben mit Typhusbacillen beschickt worden waren, konnte keine Hemmung des Wachstums konstatiert werden.)

Auch auf Gelatine war also die photodynamische Wirkung des Fluoresceins trotz seiner ausgeprägten Fluoreszenz sehr gering.

3. Versuche mit Bouillonröhren, die mit Fluorescein in verschiedenen Konzentrationen beschickt worden waren.

Die Ausführung war in diesem Falle so, daß von dem Bouillonstamm in Bouillon, die in verschiedener Konzentration mit Fluorescein gefärbt worden war, 3 Oesen gebracht wurden.

Die Exposition erfolgte in den Röhrchen, die sehr dünnwandig waren. Nach der Exposition wurden die Röhrchen umgeschüttelt. 1 ccm der Bouillon wurde sodann auf Agarplatten gebracht, die in den Brutschrank gestellt wurden.

Das Resultat war folgendes:

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1:1000	Vereinzelte Kolonieen	Zahlreiche Kolonieen
1:2000	Wenige „	„ „
1:5000	Zahlreiche „	„ „

In den weiteren Platten konnte kein Unterschied bemerkt werden. Die Kontrollröhren, die ungefärbt mit Typhusbakterien infiziert worden waren, wurden in derselben Weise behandelt. Nach der Exposition (24 Stunden) war überall gutes Wachstum eingetreten.

Eine 48-stündige Exposition bewirkte keinen Unterschied in der Wachstumshemmung.

Um zu untersuchen, ob die von der fluoreszierenden Lösung ausgehenden Strahlen auf Typhusbacillen einen Einfluß ausüben, wurde eine stark fluoreszierende alkalische Lösung hergestellt. (Das von mir hergestellte chemisch reine Fluorescein zeigte die Fluoreszenz in viel höherem Grade als die käuflichen Präparate.) Die Lösung wurde in ein größeres Becherglas gebracht. In die Lösung wurde eine am oberen Ende zugeschmolzene Reagenzröhre gesetzt, die eine Agarkultur von Bact. typhi enthielt. Als Kontrolle diente ein Präparat, das, in schwarzes Papier gewickelt, neben dem Becherglas aufbewahrt wurde.

Die Lösung wurde diffusem Tageslicht ausgesetzt.

Eine Wachstumshemmung konnte selbst nach 6-tägiger Exposition nicht bemerkt werden. Der Versuch wurde 5mal wiederholt. Ein Unterschied unter diesen Resultaten ist nicht vorhanden.

Die Lösung wurde 6 Stunden dem Sonnenlicht ausgesetzt. Eine Wachstumshemmung trat nicht ein. Nach 15-stündiger Exposition im Sonnenlicht war in der Kultur, die in der Fluoresceinlösung sich befand, eine geringe Schädigung wahrnehmbar. Eine Abtötung war in allen 5 Versuchen in keinem Fall erfolgt. Wo Sonnenlicht ohne Vorschaltung des Lichtfilters also abtötend gewirkt hatte, war bei Vorschaltung eines Strahlenfilters, bestehend aus einer Lösung von Fluorescein, nur eine geringe Wachstumshemmung zu konstatieren.

B. Versuche mit Corynebacterium diphtheriae.

Den hierzu verwendeten Stamm hatte ich aus einer frischen Diphtheriemembran isoliert.

a) Versuche im Dunkeln.

1. Wachstum im Brutschrank. Prüfung der Toxizität des Fluoresceins.

Die Versuche wurden mit Agar-Agarnährboden, mit Gelatine und Nährbouillon ausgeführt.

2. Versuche mit Agar-Agarnährboden, der mit Fluorescein in verschiedenen Konzentrationen beschickt wurde.

Es wurden dieselben Verdünnungen verwendet, wie bei den Versuchen mit Bact. typhi.

Die Ausführung der Versuche war auch im weiteren Verlauf dieselbe wie bei Bact. typhi.

Verdünnungen	Makroskopischer Befund
1 : 100	Kein Wachstum
1 : 2000	Sehr geringes Wachstum
1 : 5000	Geringes „
1 : 10 000	Mäßig gutes „
1 : 60 000	Gutes Wachtum
1 : 100 000	„ „
1 : 500 000	„ „
1 : 1 000 000	„ „

Kontrolle:

Auf allen 3 ungefärbten Röhren sehr gutes Wachstum.

Die Kulturen waren in den Konzentrationen 1:100—1:5000 schwach gelb gefärbt. Gegenüber Bact. typhi erwies sich Corynebact. diphtheriae als empfindlicher.

Die mikroskopische Untersuchung ergab eine äußerst schwach sichtbare Strukturierung des Bakterienkörpers, die wegen der geringen Aufnahme des Fluoresceins nur wenig hervortrat. Eine Beeinflussung der Form, der Größe des Bakterienkörpers ließ sich nicht konstatieren.

b) Versuche im Hellen und Dunkeln. Prüfung der photodynamischen Wirkung des Fluoresceins auf Corynebacterium diphtheriae.

Die Versuche wurden mit Agar-Agarnährboden, mit Gelatine und Nährbouillon ausgeführt.

1. Versuche mit Agar-Agarnährboden, der mit Fluorescein in verschiedenen Konzentrationen beschickt wurde.

Die Herstellung des Fluoresceinagars war dieselbe, wie bei den Untersuchungen mit Bact. typhi, ebenso die übrige Versuchsanordnung:

Dauer der Exposition (diffuses Tageslicht) 24 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1 : 1000	„ „	„ „
1 : 2000	„ „	„ „
1 : 5000	Sehr geringes Wachstum	Geringes „
1 : 10 000	Geringes Wachstum	Mäßiges „
1 : 60 000	Mäßiges „	Gutes „
1 : 100 000	Gutes Wachstum	„ „
1 : 500 000	„ „	„ „
1 : 1 000 000	„ „	„ „

Dauer der Exposition 48 Stunden

1 : 100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1 : 1000	„ „	„ „
1 : 2000	„ „	„ „
1 : 5000	Sehr geringes Wachstum	Geringes Wachstum
1 : 10 000	„ „ „	„ „ „
1 : 60 000	Geringes Wachstum	Gutes Wachstum
1 : 100 000	Gutes Wachstum	„ „
1 : 500 000	„ „	„ „
1 : 1 000 000	„ „	„ „

Als Kontrollplatten dienten zu jeder Expositionszeit je 3 Platten. Wachstumshemmung ließ sich bei 24-stündiger Exposition nicht wahrnehmen; bei 48-stündiger Exposition trat ein kleiner Unterschied hervor. Es war eine, wenn auch geringe, Wachstumshemmung eingetreten.

Die photodynamische Wirkung des Fluoresceins war auf Corynebacterium diphtheriae stärker als auf Bact. typhi.

Auch Corynebacterium diphtheriae erwies sich diffusem Tageslicht gegenüber als ziemlich resistent. Eine Abtötung konnte selbst nach 4-tägiger Exposition nicht erzielt werden. Im Sonnenlicht

konnte nach 10-stündiger Exposition kein Wachstum mehr wahrgenommen werden.

2. Versuche mit Gelatinenährboden, der mit Fluorescein in verschiedener Konzentration beschickt worden war.

Die Ausführung war dieselbe, wie bei Agar-Agarnährboden.

Dauer der Exposition 24 Stunden
(ohne Vorschaltung von Strahlenfiltern).

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1:1000	„ „	„ „
1:2000	„ „	„ „
1:5000	Sehr schwaches Wachstum	Mäßiges „
1:10 000	Geringes Wachstum	Gutes „
1:60 000	Gutes Wachstum	„ „
1:100 000	„ „	„ „
1:500 000	„ „	„ „
1:1 000 000	„ „	„ „

Dauer der Exposition 48 Stunden

1:100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1:1000	„ „	„ „
1:2000	Sehr schwaches Wachstum	„ „
1:5000	Geringes Wachstum	Gutes „
1:10 000	„ „	„ „
1:60 000	Gutes Wachstum	„ „
1:100 000	„ „	„ „
1:500 000	„ „	„ „
1:1 000 000	„ „	„ „

Merkwürdig war bei dieser Versuchsreihe, daß in der Verdünnung 1:2000 in den belichteten Platten ein, wenn auch geringes, Wachstum eingetreten, war, während in der unbelichteten Platte kein Wachstum zu konstatieren war, daß in diesem Fall die photodynamische Wirkung nicht eine wachstumshemmende gewesen war, sondern eine wachstumsbefördernde.

In einem weiteren Versuch, der mit derselben Verdünnung zur genaueren Orientierung angestellt worden war, zeigte sich jedoch das Verhältnis nicht wieder, so daß dieses sehr auffallende Ergebnis wohl als eine Zufälligkeit betrachtet werden muß, hervorgerufen vielleicht dadurch, daß bei der Bestreichung der Platten relativ mehr Diphtheriebacillen auf die der Belichtung auszusetzenden Platte kamen, als auf die zur Aufbewahrung im Dunkeln bestimmten.

Die photodynamische Wirkung des Fluoresceins war auch bei Benützung von Gelatinenährboden gering. In der Verdünnung 1:100 bis 1:2000 hatte es giftig gewirkt.

3. Versuche mit Bouillonröhren, die mit Fluorescein in verschiedener Konzentration beschickt worden waren.

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei Bact. typhi.

Das Resultat war folgendes:

Dauer der Exposition 24 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1:1000	„ „	„ „
1:2000	Vereinzelte Kolonieen	Vereinzelte Kolonieen
1:5000	„ „	Zahlreiche Kolonieen
1:10 000	Zahlreiche Kolonieen	„ „
1:60 000	„ „	„ „
1:100 000	„ „	„ „
1:500 000	„ „	„ „
1:1 000 000	„ „	„ „

Die Kontrollröhren, deren Versuchsanordnung dieselbe war wie bei Bact. typhi, zeigten nach der Exposition von 24 Stunden gutes Wachstum.

Dauer der Exposition 48 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1 : 1000	„ „	Vereinzelte Kolonieen
1 : 2000	Spärliche Kolonieen	„ „
1 : 5000	„ „	„ „
1 : 10 000	Zahlreiche Kolonieen	Zahlreiche Kolonieen
1 : 60 000	„ „	„ „
1 : 100 000	„ „	„ „
1 : 500 000	„ „	„ „
1 : 1 000 000	„ „	„ „

Kontrollröhren zeigten nach 48-stündiger Exposition gutes Wachstum.

Dauer der Exposition 72 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1 : 1000	„ „	„ „
1 : 2000	Spärliche Kolonieen	Zahlreiche Kolonieen
1 : 5000	Vereinzelte „	„ „
1 : 10 000	Zahlreiche „	„ „
1 : 60 000	„ „	„ „
1 : 100 000	„ „	„ „
1 : 500 000	„ „	„ „
1 : 1 000 000	„ „	„ „

Die photodynamische Wirkung des Fluoresceins war nach 72-stündiger Exposition in diffusem Tageslicht besser zum Ausdruck gekommen, als bei kürzerer Exposition. Immerhin war sie auch bei dieser Expositionszeit gegenüber einigen anderen weiter unten beschriebenen Präparaten gering.

Um zu untersuchen, ob die von der fluoreszierenden Lösung ausgehenden Strahlen einen Einfluß auf das Wachstum von Corynebacterium diphtheriae ausüben, wurde der bei Bact. typhi beschriebene Versuch auch beim Diphtheriebacillus wiederholt.

Eine Wachstumshemmung konnte selbst nach mehrtägiger Exposition bei Anwendung von Agarkulturen, Gelatinekulturen, Bouillonkulturen nicht beobachtet werden.

Abtötung der Diphtheriebakterien erfolgte bei Anwendung von Sonnenlicht nach 10 Stunden.

C. Versuche mit Sarcina flava.

Nach meinen Versuchen (59) über die Einwirkung von Kristallviolett auf verschiedene aus der Butter isolierten Bakterien war es mir interessant, auch die Einwirkung der photodynamischen Substanzen auf die teilweise sehr resistenten Arten zu untersuchen.

a) Versuche im Dunkeln.

1. Wachstum im Brutschrank. Prüfung der Toxizität des Fluoresceins auf Sarcina flava.

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei Bact. typhi.

Konzentration	Makroskopischer Befund
1 : 100	Spärliches Wachstum
1 : 1000	Gutes Wachstum
1 : 2000	„ „
1 : 5000	„ „
1 : 10 000	„ „
1 : 60 000	„ „
1 : 100 000	Sehr gutes Wachstum
1 : 500 000	„ „ „
1 : 1 000 000	„ „ „

Kontrolle:

Auf allen 3 ungefärbten Röhren sehr gutes Wachstum.

Die Farbe der Kulturen war deutlich erhalten. Eine bemerkbare Einwirkung des Fluoresceins war nur bei der Konzentration 1:100 zu konstatieren. Das Fluorescein wirkte also nicht so giftig auf Sarcina flava wie auf Bact. typhi und Corynebacterium diphtheriae.

b) Versuche im Hellen und Dunkeln. Prüfung der photodynamischen Wirkung des Fluoresceins auf Sarcina flava.

Die Versuche wurden mit Agar-Agarnährboden, mit Gelatine und Nährbouillon ausgeführt.

1. Versuche mit Agar-Agarnährboden, der mit Fluorescein beschickt wurde.

Dauer der Exposition 24 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Spärliches Wachstum	Spärliches Wachstum
1:1000	Gutes Wachstum	Gutes Wachstum
1:2000	„ „	„ „

In den übrigen Verdünnungen ließen sich keine Wachstumsunterschiede unter den exponierten und nichtexponierten Platten wahrnehmen.

Als Kontrollplatten dienten 3 Petri-Platten, die, mit nichtgefärbtem Agar gefüllt, diffusem Tageslicht ausgesetzt wurden. Eine Wachstumshemmung ließ sich nach 24 Stunden nicht wahrnehmen.

Dauer der Exposition 48 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Spärliches Wachstum	Mäßig gutes Wachstum
1:1000	Gutes Wachstum	Gutes Wachstum
1:2000	„ „	„ „
1:5000	„ „	„ „

In den übrigen Verdünnungen war das Wachstum auf den exponierten und nicht exponierten Platten gleich gut.

Die photodynamische Wirkung war demnach äußerst gering. Selbst bei mehrtägiger Exposition ließen sich keine Unterschiede konstatieren.

2. Versuche mit Gelatinenährboden.

Die Ausführung war dieselbe wie bei Agarnährboden:

Unterschiede gegenüber dem Wachstum auf Agar-Agarnährboden traten nicht hervor.

3. Versuche mit Bouillonröhren.

Unterschiede gegenüber dem Wachstum auf Agar-Agarnährboden traten nicht hervor.

Zur Untersuchung der von der Fluoresceinlösung ausgehenden Strahlen und ihrer Einwirkung auf Sarcina flava wurde derselbe Versuch wie bei Bact. typhi und Corynebacterium diphtheriae angestellt. Eine Einwirkung konnte nicht wahrgenommen werden.

Eine Abtötung erfolgte im Sonnenlicht erst nach 36-stündiger Exposition.

D. Versuche mit Bacterium prodigiosum.

Diese Art war von mir aus Butter isoliert worden, und zeigte auf Glycerinagar üppiges Wachstum mit Bildung des typischen roten Farbstoffes.

1. Wachstum im Brutschrank. Prüfung der Toxizität des Fluoresceins auf Bacterium prodigiosum.

An Stelle des 37-grädigen Brutschranks trat der 25-grädige.

Konzentration	Makroskopischer Befund
1:100	Kein Wachstum
1:1000	Spärliches Wachstum
1:2000	Mäßig gutes Wachstum
1:5000	Gutes Wachstum
1:10 000	„ „
1:60 000	„ „
1:100 000	„ „
1:500 000	„ „
1:1 000 000	„ „

Die Einwirkung des Fluoresceins war auf Bacterium prodigiosum eine intensivere als z. B. auf Sarcina flava.

2. Prüfung im Hellen.

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1:1000	Sehr spärliches Wachstum	Spärliches Wachstum
1:2000	Spärliches Wachstum	Mäßig gutes Wachstum
1:5000	Gutes Wachstum	Gutes Wachstum
1:10 000	„ „	„ „
1:60 000	„ „	„ „
1:100 000	„ „	„ „
1:1 000 000	„ „	„ „

Auf den Kontrollplatten war nach 24-stündiger Exposition immer noch gutes Wachstum zu erzielen.

Die photodynamische Wirkung war unverkennbar, jedoch auch bei Bact. prodigiosum sehr schwach.

Die Benützung von Gelatine und Nährbouillon änderte an dem Ausfall der Versuche nichts.

Dauer der Exposition 48 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Kein Wachtum	Kein Wachstum
1:1000	Spärliches Wachstum	Spärliches Wachstum
1:2000	„ „	Mäßig gutes „

In den übrigen Verdünnungen ließ sich kein Unterschied des Wachstums bemerken.

Die Wirkung des diffusen Tageslichts auf die 48 Stunden lang exponierten ungefärbten Kontrollplatten war äußerst gering. Sonnenlicht bewirkte Abtötung nach 16 Stunden langer Belichtung.

Eine Strahlenwirkung bei Vorschaltung eines Filters, bestehend aus einer Lösung von Fluorescein, konnte nicht beobachtet werden.

E. Versuche mit Micrococcus rosaceus.

Derselbe war ebenfalls aus Stuttgarter Marktbutter von mir isoliert worden.

Die Versuche wurden in derselben Weise wie bei den übrigen Bakterienarten ausgeführt.

Die photodynamische Wirkung war auch auf Micrococcus rosaceus sehr gering und deckt sich etwa mit der bei Sarcina lutea (flava).

Die Versuche im Hellen und Dunkeln auf Agarplatten ergaben folgendes:

Dauer der Exposition 48 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Spärliches Wachstum	Mäßig gutes Wachstum
1:1000	Gutes „	Gutes Wachstum

In den übrigen Verdünnungen ließen sich unter den exponierten und nichtexponierten Platten keine Wachstumsunterschiede konstatieren.

Die Benützung von Bouillon und Gelatine als Nährmedien bewirkte keine Aenderung des Resultates.

F. Versuche mit Micrococcus sulfureus.

Dieser Mikroorganismus war von mir aus der Stuttgarter Butter isoliert worden.

Er zeigte sich gegenüber dem Fluorescein sehr resistent und scheint damit eine Eigenschaft zu haben, die allen Sarcinen und Kokken zukommt. Offenbar ist es die dicke Membran dieser Mikroorganismen, die eine Aufnahme des Fluoresceins verhindert und so den Einfluß des Farbstoffs ausschaltet.

Die photodynamische Wirkung war dieselbe wie auf Sarcina lutea und Micrococcus rosaceus.

G. Versuche mit Actinomyces.

Diese Art ist von mir aus der Stuttgarter Butter isoliert worden und kommt sehr häufig auch als eine Verunreinigung von Platten vor. Bei Luftuntersuchungen in Stuttgart konnte ich diese Art fast in jeder Platte erkennen.

	Exposition 3 Tage	
Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Wenig Wachstum	Wenig Wachstum
1 : 1000	Gutes „	Gutes „

In den anderen Platten konnte kein Unterschied unter den exponierten und nichtexponierten Platten wahrgenommen werden.

Eine photodynamische Wirkung war selbst bei 3-tägiger Exposition demnach nicht zu konstatieren. Wiederum wird es die derbe Hülle von Actinomyces sein, die an diesem Ausfall schuld ist.

Die Actinomyces-Art, die ich zu meinen Untersuchungen benützte, war übrigens auch gegen Sonnenlicht sehr resistent. Selbst nach 100-stündiger Besonnung gelang es mir immer noch lebensfähige Kulturen aus dem belichteten Präparat zu erhalten.

H. Versuche mit Saccharomyces rosaceus.

Dieser Mikroorganismus war von mir aus Stuttgarter Butter isoliert worden.

Auch auf diesen war die photodynamische Wirkung so schwach, daß sie nach 3-tägiger Belichtung in diffusem Tageslicht noch nicht beobachtet werden konnte.

Bei Belichtung im Sonnenlicht starb diese Art in 30 Stunden.

2. Versuche mit Fluoresceinanilid.

Die Herstellung dieses Körpers wurde von mir auf folgende Weise ausgeführt: 20 g Fluorescein, 80 g frisch destilliertes Anilin und 40 g salzsaures Anilin wurden etwa 7 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die violettrötliche Masse wurde sodann zur Abtreibung des Anilins einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Der zurückbleibende feste Teil wurde aus heißem verdünntem Alkohol umzukristallisieren versucht. Es konnten jedoch auf diese Weise keine wasserhellen Kristalle erhalten werden. Der verunreinigende rote Farbstoff konnte erst durch mehrfaches Kochen mit sehr viel Tierkohle teilweise entfernt werden. Es

wurde aus diesem Grunde der Versuch gemacht, durch Auflösen des unreinen Fluoresceinanilids in sehr verdünnter Natronlauge, Kochen mit Tierkohle, Zusatz von verdünnter Salzsäure und Umkristallisieren in verdünntem Alkohol ein reines Präparat zu erhalten.

Da über die Verunreinigung durch den roten Farbstoff nichts in den kurzen Angaben von O. Fischer und E. Hepp (60) „Ueber Fluoresceinanilid" enthalten war, so konnte dieselbe von dem salzsauren Anilin herrühren, das zu dem Versuch verwendet worden war. Es wurde zu den weiteren Versuchen das salzsaure Anilin in reinem Zustand nach folgender Methode hergestellt:

Konzentrierte Salzsäure wurde unter Umrühren mit Anilin versetzt, die abgeschiedenen Kristalle abgesaugt und auf dem Tonteller getrocknet. Auf diese Weise wurden 50 g salzsaures Anilin hergestellt, die zur Herstellung weiterer Mengen Fluoresceinanilids benützt wurden.

25 g Fluorescein, 100 g Anilin, 50 g salzsaures Anilin wurden wie oben 7 Stunden am Rückflußkühler gekocht und das Anilin mit Wasserdampf abgetrieben. Die zurückbleibende rotviolette feste Masse wurde mit 200 g Wasser, dem 10 ccm 10-proz. Natronlauge zugesetzt waren, bis zur vollständigen Lösung (nach 2 Stunden) gekocht. Sodann wurde sehr viel Tierkohle zugegeben und wiederum so lange gekocht, bis ein Probefiltrat fast farblos wurde (2 Stunden). Das Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure schwach angesäuert und das ausgeschiedene bräunlichweiß aussehende Fluoresceinanilid abgesaugt. Durch dreimaliges Umkristallisieren in verdünntem heißem Alkohol, wobei noch einmal mit Tierkohle aufgekocht wurde, konnte ein annähernd weißes Präparat erhalten werden.

Das Analysenresultat war folgendes:

	Berechnet	Gefunden
C	77,03 Proz.	76,73 Proz.
H	4,19 „	4,46 „
N	2,905 „	2,706 „

Das Fluoresceinanilid hatte folgende Eigenschaften:

	Löslichkeit:
Alkohol	Leicht löslich
Eisessig	„ „
Wasser	Sehr schwer löslich

Die alkalische Lösung zeigt stark grüne Fluoreszenz. Die Lösung in konzentrierter Schwefelsäure ist gelb gefärbt und fluoresziert ebenfalls, jedoch schwächer als die alkalische Lösung. Das Fluoresceinanilid ist durch Kochen mit verdünnten Alkalien und verdünnten Säuren nicht spaltbar. Der Schmelzpunkt des Fluoresceinanilids kann nicht bestimmt werden, da es sich beim Erhitzen zersetzt. Beim Erhitzen über 200° wird das Fluoresceinanilid rot und sublimiert. Das Sublimat ist rot gefärbt.

Die Herstellung der Verdünnungen war dieselbe wie bei Fluorescein. 1 : 100 (mit $^1/_4$ N-Natronlauge). Von dieser ausgehend durch Verdünnen mit Wasser (sterilisiert, destilliert) 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 5000, 1 : 10000, 1 : 60000, 1 : 100000, 1 : 500000, 1 : 1000000.

Als Nährböden benützte ich Agar-Agar, Gelatine und Bouillon.

Zu je 5 ccm der flüssigen Nährböden wurde 1 ccm der Lösung des Fluoresceinanilids gebracht.

A. Versuche mit Bacterium typhi.

Der hierzu verwendete Typhusstamm war derselbe, wie bei den Versuchen mit Fluorescein.

a) Versuche im Dunkeln.

1. Wachstum im Brutschrank. Prüfung der Toxizität des Fluoresceinanilids.

Konzentration	Makroskopischer Befund
1:100	Kein Wachstum
1:1000	Gutes „

In allen anderen Verdünnungen war ebenfalls gutes Wachstum zu konstatieren.

Kontrolle:

Auf allen 3 ungefärbten Röhrchen sehr gutes Wachstum.

Die Agglutinationsprüfungen der Typhusbakterien, die auf den mit Fluoresceinanilid gefärbten Nährböden gewachsen waren, ergaben folgendes:

(Die Versuchsanordnung war dieselbe, wie bereits bei den Fluoresceinversuchen beschrieben.)

Konzentration	Mikroskopischer Befund
1:100	Keine Bakterien
1:1000	Sehr viele gut bewegliche Bakterien
	Nach 25 Minuten eingetretene Agglutination

Die Agglutination war auch bei den weiteren Verdünnungen vollständig nach 25 Minuten eingetreten.

Auf Bact. typhi wirkte demnach Fluoresceinanilid schwächer als Fluorescein.

b) Versuche im Hellen und Dunkeln. Prüfung der photodynamischen Wirkung des Fluoresceinpräparates.

Die Versuche wurden mit Agar-Agar-Nährboden, Gelatine und Bouillon ausgeführt.

Dauer der Exposition 24 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1:1000	Spärliches Wachstum	Gutes „
1:2000	Gutes „	„ „

In allen anderen Verdünnungen ließ sich kein Unterschied unter exponierten und nichtexponierten Platten wahrnehmen. Die photodynamische Wirkung ließ sich bei Fluoresceinanilid bei 24-stündiger Exposition in diffusem Tageslicht konstatieren, da die Kontrollplatten, die ungefärbt diffusem Tageslicht ausgesetzt worden waren, nach 24 Stunden keine Wachstumshemmung erkennen ließen.

Die photodynamische Wirkung trat noch stärker in der Verdünnung 1:1000 hervor, wenn die Platten 48 Stunden exponiert worden waren.

Schwache photodynamische Wirkung war bei 48-stündiger Exposition auch in der Verdünnung 1:2000 zu konstatieren.

Die Verwendung von Gelatine und Bouillon bewirkte keine Veränderung der Versuchsresultate.

B. Versuche mit Corynebacterium diphtheriae.

a) Versuche im Dunkeln.

1. Wachstum im Brutschrank. Prüfung der Toxizität des Fluoresceinanilids auf Corynebacterium diphteriae.

Konzentration	Makroskopischer Befund
1 : 100	Kein Wachstum
1 : 1000	Gutes „

Auf allen anderen Platten war ebenfalls gutes Wachstum eingetreten. Das Fluoresceinanilid hatte demnach nur in der Konzentration 1 : 100 giftig gewirkt, was offenbar neben der toxischen Wirkung des Fluoresceinanilids auch der Giftwirkung der Natronlauge zuzuschreiben ist.

b) Versuche im Hellen und Dunkeln. Prüfung der photodynamischen Wirkung des Fluoresceinanilids auf Corynebacterium diphtheriae.

Die Versuche wurden mit Agar-Agar-Nährboden, Gelatine und Bouillon ausführt.

Exposition 24 Stunden

Konzentration	Hell	Dunkel
1 : 100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1 : 1000	Sehr geringes Wachstum	Gutes „
1 : 2000	Geringes Wachstum	„ „
1 : 5000	Gutes „	„ „

Auf den Kontrollplatten war überall gutes Wachstum aufgetreten.

Die photodynamische Wirkung des Fluoresceinanilids auf Corynebacterium diphtheriae ließ sich demnach in der Verdünnung 1 : 1000 und 1 : 2000 deutlich erkennen.

Exposition 48 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1 : 1000	Sehr schwaches Wachstum	Gutes „
1 : 2000	Schwaches „	„ „
1 : 5000	Gutes „	„ „

Auf den Kontrollplatten war überall gutes Wachstum eingetreten.

Die photodynamische Wirkung war bei Exposition von 48 Stunden in den Verdünnungen 1 : 1000 und 1 : 2000 etwas stärker als bei der Exposition von nur 24 Stunden.

Exposition 4 Tage

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Kein Wachstum	Kein Wachstum
1 : 1000	Sehr schwaches Wachstum	Gutes „
1 : 2000	Schwaches „	„ „
1 : 5000	„ „	„ „
1 : 10 000	Gutes „	„ „

In allen anderen Verdünnungen war gutes Wachstum eingetreten, ebenso war in den Kontrollplatten nur eine äußerst geringe Schwächung eingetreten. Die photodynamische Wirkung steigerte sich also bei längerer Exposition.

Eine Tötung in diffusem Tageslicht bei Benützung von photodynamischen Substanzen gelang erst nach 5-tägiger Exposition und zwar nur in der Verdünnung 1 : 1000. Das Wachstum in der Verdünnung 1 : 2000 war wohl sehr schwach, jedoch enthielten die Kulturen immer noch lebensfähige Bakterien. Die Verwendung von Gelatine und Bouillon als Nährmedien bewirkten keinerlei Verschiebung des Versuchsresultats.

C. Versuche mit Sarcina lutea (flava).

a) Versuche im Dunkeln.

1. Wachstum im Brutschrank. Prüfung der Toxizität des Fluoresceinanilids auf Sarcina lutea (flava).

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei den früheren Versuchen.

Konzentration	Makroskopischer Befund
1 : 100	Mäßig gutes Wachstum
1 : 1000	Gutes Wachstum

In allen anderen Verdünnungen war gutes Wachstum eingetreten. Die toxische Wirkung des Fluoresceinanilids auf Sarcina flava war demnach geringer als die toxische Wirkung des Fluoresceins.

b) Versuche im Hellen und Dunkeln. Prüfung der photodynamischen Wirkung des Fluoresceinanilids auf Sarcina flava.

Die Versuche wurden mit Agar-Agar-Nährboden, Gelatine und Bouillon ausgeführt.

Dauer der Exposition 24 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Sehr geringes Wachstum	Mäßig gutes Wachstum
1 : 1000	Geringes „	Gutes Wachstum
1 : 2000	Mäßig gutes „	„ „
1 : 5000	Gutes „	„ „

In allen anderen Verdünnungen war gutes Wachstum eingetreten. Auf den Kontrollplatten konnte bei einer Exposition von 24 Stunden keine Schädigung durch diffuses Tageslicht wahrgenommen werden.

Dauer der Exposition 48 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Sehr geringes Wachstum	Mäßig gutes Wachstum
1 : 1000	„ „ „	Gutes Wachstum
1 : 2000	Geringes Wachstum	„ „
1 : 5000	Gutes „	„ „
1 : 10 000	„ „	„ „

Dauer der Exposition 4 Tage

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Kein Wachstum	Mäßig gutes Wachstum
1 : 1000	Sehr geringes Wachstum	Gutes Wachstum
1 : 2000	„ „ „	„ „
1 : 5000	„ „ „	„ „
1 : 10 000	Schwaches „	„ „
1 : 60 000	Gutes „	„ „

Auf den dem diffusen Tageslicht ausgesetzten Platten waren die Kulturen etwas abgeschwächt, jedoch waren sie gegenüber den auf Fluoresceinanilidplatten angegangenen Kulturen wesentlich kräftiger.

Die Verwendung von Gelatine und Bouillon als Nährmedien bewirkte keinerlei Verschiebung des Versuchsresultats.

D. Versuche mit Micrococcus rosaceus.

Die Versuche im Hellen und Dunkeln ergaben folgendes:

Dauer der Exposition 48 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Sehr geringes Wachstum	Mäßig gutes Wachstum
1 : 1000	„ „ „	Gutes Wachstum
1 : 2000	„ „ „	„ „
1 : 5000	Gutes Wachstum	„ „

In den übrigen Verdünnungen ließ sich kein Unterschied unter den exponierten und nichtexponierten Platten wahrnehmen.

Dauer der Exposition 4 Tage

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Kein Wachstum	Mäßig gutes Wachstum
1 : 1000	Sehr geringes Wachstum	Gutes Wachstum
1 : 2000	„ „ „	„ „
1 : 5000	Mäßig gutes „	„ „
1 : 10 000	Gutes Wachstum	„ „

In den übrigen Verdünnungen ließ sich kein Unterschied unter den exponierten und nicht exponierten Platten konstatieren.

Bei Benützung von Gelatine und Bouillon konnten keine Wachstumsunterschiede wahrgenommen werden.

Die photodynamische Wirkung des Fluoresceinanilids war auf Micrococcus rosaceus ähnlich stark wie auf Sarcina lutea (flava). Die Platten, die ungefärbt diffusem Tageslicht ausgesetzt worden waren, zeigten sehr geringe Abschwächung.

G. Versuche mit Actinomyces.

Exposition 3 Tage

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Sehr geringes Wachstum	Gutes Wachstum
1 : 1000	Geringes „	„ „
1 : 2000	Mäßig gutes „	„ „
1 : 5000	Gutes Wachstum	„ „

In allen anderen Verdünnungen ließ sich kein Unterschied unter den exponierten und nicht exponierten Platten konstatieren.

Die photodynamische Wirkung des Fluoresceinanilids auf Actinomyces war wesentlich stärker als die des Fluoresceins.

H. Versuche mit Saccharomyces rosaceus.

Exposition 4 Tage

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Mäßig gutes Wachstum	Gutes Wachstum
1 : 1000	Gutes Wachstum	„ „

In allen anderen Verdünnungen ließen sich keine Wachstumsunterschiede zwischen exponierten und nichtexponierten Platten wahrnehmen.

Die photodynamische Wirkung des Fluoresceinanilids war demnach stärker als die des Fluoresceins. Saccharomyces rosaceus zeigte nach 4-tägiger Exposition in diffusem Tageslicht nur sehr geringe Wachstumshemmung.

3. Versuche mit Eosin.

Zur Anwendung gelangte das Handelspräparat von E. Merck, Darmstadt und zwar „Eosin gelblich“ und „Eosin bläulich“.

Die Verdünnungen, mit denen die Nährböden gefärbt wurden, waren folgende:

Eosin gelblich	Eosin bläulich
Alle Verdünnungen wurden mit destilliertem sterilisierten Wasser hergestellt.	
1 : 100	1 : 100
1 : 500	1 : 500
1 : 1000	1 : 1000
1 : 2000	1 : 2000
1 : 3000	1 : 3000
1 : 4000	1 : 4000
1 : 5000	1 : 5000
1 : 10 000	1 : 10 000
1 : 20 000	1 : 20 000

Eosin gelblich	Eosin bläulich
Alle Verdünnungen wurden mit destilliertem sterilisierten Wasser hergestellt.	
1 : 50 000	1 : 50 000
1 : 100 000	1 : 100 000
1 : 500 000	1 : 500 000
1 : 1 000 000	1 : 1 000 000

Eosin gelblich.

Die Herstellung der zu färbenden Nährböden sowie die Ausführung der Färbung war dieselbe wie bei Fluorescein beschrieben.

A. Versuche mit Bacterium typhi.

Der hierzu verwendete Typhusstamm war derselbe wie bei den Versuchen mit Fluorescein. Es wurden zu den Versuchen stets 24 Stunden alte Kulturen genommen.

a) Versuche im Dunkeln.

1. Wachstum im Brutschrank. Prüfung der Toxizität des Eosins nach 24 Stunden:

Verdünnungen	Makroskopischer Befund
1 : 100	Gutes Wachstum. Kultur stark rot gefärbt. Typisch schimmernd. Nährboden rot
1 : 500	Gutes Wachstum. Kultur blaßrötlich. Nährboden rosa. Typisches Wachstum
1 : 1000	Gutes typisches Wachstum. Kultur blaßrötlich. Nährboden rosa
1 : 2000	„ „ „ „ blaßrot. „ „
1 : 3000	„ „ „ „ rötlich. „ grünrot
1 : 4000	„ Wachstum. Kultur blaßrot. Nährboden grünrot
1 : 5000	„ „ „ „ „ „
1 : 10 000	„ „ „ „ „ blaßgrünrot
1 : 20 000	„ „ „ schwach blaßrot. Nährboden zeigt keine Farbe mehr
1 : 50 000	Gutes Wachstum. Kultur schwachblaßrot. Nährboden farblos
1 : 100 000	„ „ Nährboden farblos. Kultur blaßrosa
1 : 500 000	„ „ Wachstum typisch. Kultur wie Nährboden farblos
1 : 1 000 000	„ „ Nährboden wie Kultur farblos.

Das sehr Auffallende an diesen Untersuchungen war die stark hervortretende Färbung der Kulturen. Die Färbung der Kultur war immer intensiver als die des Nährbodens. Der Uneingeweihte hätte z. B. die Kulturen, die auf der Verdünnung 1 : 100 000 gewachsen sind, niemals für Bact. typhi gehalten, sondern etwa für Micr. roseus. Die Typhusbacillen hatten den Farbstoff, der in sehr geringer Menge dem Nährboden beigemengt war (der Nährboden war in dieser Verdünnung farblos), förmlich extrahiert.

Die mikroskopische Untersuchung der auf den Eosinnährböden gewachsenen Typhuskulturen ergab folgende interessante Einzelheiten der „vitalen Färbung".

Verdünnung 1 : 100. Die Stäbchen sind sehr gut beweglich.

Die dünne Membran des Bakteriums war blaßrot gefärbt. Der übrige Bakterienkörper zeigte keine oder doch nur eine schwachrosa Färbung. In dem Bakterienleib befinden sich drei intensiv rot gefärbte Körner. Zwei dieser Körner sind polar angeordnet, das dritte befindet sich an der Seite oder in der Mitte. Da sich die Bakterien wälzen, bei der Bewegung umdrehen, so ruft es den Eindruck hervor, als ob dieses im Innern sich befindliche Körnchen sich selbst bewegen würde. Einmal findet man das Körnchen links, im nächsten Augenblick befindet es sich an der rechten Seite. Uebrigens ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen,

daß dieses innere Körnchen sich wirklich bewegt. In der Regel befindet sich das innere Körnchen nicht in der Mitte des Bakterienkörpers, sondern entweder in der oberen oder unteren Hälfte.

Da die Bakterien zur Untersuchung im hängenden Tropfen vorher mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt worden waren, war noch zu untersuchen, ob durch diese Lösung eine Extraktion des vielleicht an der Membran haftenden Farbstoffs stattgefunden habe, und erst durch die Kochsalz-Eosinlösung die Körnchenfärbung zu stande gekommen sei.

Es wurden zu dieser Untersuchung folgende Versuche gemacht:

1) Es wurde eine Kultur von dem Eosinnährboden ohne vorherige Aufschwemmung mit physiologischer Kochsalzlösung auf das Deckglas gebracht.

Die mikroskopische Untersuchung ergab auch in diesem Fall die typische, stark hervortretende Körnchenfärbung.

2) Es wurde von der Kontrollröhre, die nicht mit Typhus infiziert worden war, ein Abstrich gemacht und mit einer Eosinlösung 1 : 100 gefärbt. Die Färbung war bei 1—30 Minuten langer Einwirkung immer eine sehr schwache. Polkörner oder irgend eine deutlich sichtbare Strukturierung war nicht bemerkbar. Der ganze Bakterienkörper war vollständig gleichmäßig rosarot gefärbt.

Es mußte sich demnach um eine Eigenschaft des lebenden Bakteriums handeln, das Eosin selbst in sehr großer Verdünnung aus dem Nährmedium zu extrahieren und in die Körner aufzunehmen.

Welche Bedeutung diesen Körnern, die im ungefärbten Präparat übrigens oft schwach sichtbar werden und z. B. von Möller erwähnt werden, ist unbekannt. Es liegt nahe, diese Körner, die nach dem obigen Befunde den Farbstoff extrahieren, für eine Art Schutzorgan zu halten, dessen Funktion darin besteht, schädliche Körper in sich aufzunehmen und dadurch für den übrigen Bakterienleib unschädlich zu machen.

Für diese Annahme könnte der Umstand sprechen, daß die Kulturen in der Verdünnung von 1 : 100 noch sehr gut gediehen.

Zu bemerken ist noch, daß die Körnchenfärbung am schönsten in den stärkeren Konzentrationen (1 : 100, 1 : 500) hervortrat.

Die Körnchenfärbung läßt sich zweifellos zur Differentialdiagnose von Bacterium coli und Bacterium typhi verwerten. Die Färbung ist sehr typisch und findet sich bei Bact. coli, der keine Körnchen zeigt, nicht. Bei meinen zahlreichen Untersuchungen über die Isolierung von Typhusbacillen aus Kot und Urin von Typhusverdächtigen habe ich gefunden, daß die Beobachtung der morphologischen Verhältnisse der verdächtigen Kolonieen unter Benützung der einfachsten Nährböden (Gelatine, Agar) zum mindesten ebenso schnell zum Ziele führt, als die Anwendung aller der zahlreichen zur Differentialdiagnose von Coli- und Typhusbakterien empfohlenen „Spezialnährböden“. Und gerade die Körnchenfärbung ist ein sehr deutliches Merkmal, dessen Beobachtung bei Anwendung eines so einfachen Nährbodens, wie es der Eosinnährboden ist, gar keine Schwierigkeiten macht.

Versuche darüber, wie weit die Kot- und Urinuntersuchung auf Typhusbacillen dadurch vereinfacht werden kann, daß man von dem zu untersuchenden Objekt Mengen in mit Eosin gefärbte Bouillon bringt, in den Brutschrank stellt und sodann unter dem Mikroskop untersucht, stelle ich zur Zeit an. Sie berühren das vorliegende Thema, Unter-

suchungen über photodynamische Substanzen, nicht. Auch hierüber, wie weit die Färbung bei Weiterzüchtung auf ungefärbten Nährböden anhält, sind Untersuchungen eingeleitet.

Mit allen Kulturen wurden Agglutinationsprüfungen vorgenommen. (Die Ausführung derselben war dieselbe wie bei Fluorescein beschrieben.) Das Ergebnis war folgendes:

Verdünnungen	Mikroskopischer Befund
1 : 100	Nach 25 Minuten eingetretene Agglutination
1 : 500	„ 25 „ „ „

Die Agglutination war in allen Verdünnungen positiv nach 25 Minuten, war also gegenüber dem Kontrollpräparat unverändert.

b) Versuche im Hellen und Dunkeln. Prüfung der photodynamischen Wirkung des Eosins auf Typhusbacillen.

Dauer der Exposition 24 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Gutes Wachstum	Gutes Wachstum
1 : 500	„ „	„ „

In den übrigen Verdünnungen ließ sich ebenfalls kein Unterschied unter den exponierten und nicht exponierten Platten wahrnehmen.

Dauer der Exposition 48 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Abgeschwächtes Wachstum	Gutes Wachstum
1 : 500	„ „	„ „
1 : 1000	Mäßig gutes „	„ „
1 : 2000	Gutes Wachstum	„ „

In den übrigen Verdünnungen ließ sich kein Unterschied unter den exponierten und nichtexponierten Platten wahrnehmen.

Dauer der Exposition 72 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Sehr schwaches Wachstum	Gutes Wachstum
1 : 500	Abgeschwächtes „	„ „
1 : 1000	„ „	„ „
1 : 2000	Gutes Wachstum	„ „

Die Kontrollplatten (ungefärbt und belichtet) ließen ein mäßig gutes Wachstum erkennen, jedoch wesentlich stärker als auf den Platten, die mit Eosin gefärbt exponiert worden waren.

Die photodynamische Wirkung des Eosins ist wesentlich stärker als die des Fluoresceins und Fluoresceinanilids.

Die Verwendung von Gelatine und Bouillon bewirkte keine Unterschiede.

B. Versuche mit Corynebacterium diphtheriae.

Der zu den Versuchen verwendete Diphtheriebacillenstamm war derselbe wie bei den früheren Versuchen.

a) Versuche im Dunkeln.

1. Wachstum im Brutschrank. Prüfung der Toxizität des Eosins. Versuche mit Agar-Agar-Nährböden:

Verdünnungen	Makroskopischer Befund
1 : 100	Gutes Wachstum. Kultur rot
1 : 500	„ „ „ „
1 : 1000	„ „ „ „
1 : 2000	„ „ „ „
1 : 3000	„ „ „ „
1 : 4000	„ „ „ „
1 : 5000	„ „ „ „

Verdünnungen	Makroskopischer Befund
1 : 10 000	Mäßig gutes Wachstum. Rosarote Kolonie
1 : 20 000	Gutes Wachstum. Rosarote Kolonie
1 : 50 000	„ „ Blaßrote Kultur
1 : 100 000	„ „ Weiße „
1 : 500 000	„ „ „ „
1 : 1 000 000	„ „ „ „

Auch die Diphtheriebacillen hatten den Eosinfarbstoff des Nährbodens an sich gezogen. In der Verdünnung 1 : 10000, wo der Nährboden nur ganz schwach rot, kaum sichtbar gefärbt, war die Kultur deutlich rot. Es war unschwer, aus der mehr oder minder intensiven Farbe der Kultur auf den Verdünnungsgrad des Farbstoffs im Nährboden zu schließen [1]).

Die mikroskopische Untersuchung von den Kulturen der Verdünnungen 1 : 100, 1 : 500 ergab auffallend viele krumm gebogene Bakterien, die die auf dem ungefärbten Nährboden gewachsenen Kulturen nicht aufwiesen.

Alle Diphtheriebacillen zeigten die typische „Zebrastruktur".

Wie weit Agar-Agar-Nährboden mit Eosin gefärbt den Blutserumkulturen bei Züchtung von Diphtheriebacillen aus Diphtheriemembranen vorzuziehen ist, wird durch weitere Versuche zur Zeit festgestellt.

b) Versuche im Hellen und Dunkeln. Prüfung der photodynamischen Wirkung des Eosins auf Corynebacterium diphtheriae.

Versuche mit Agar-Agar-Platten:

Dauer der Exposition 24 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Mäßig gutes Wachstum	Gutes Wachstum
1 : 500	„ „ „	„ „
1 : 1000	Gutes Wachstum	„ „

Bei allen anderen Verdünnungen ließen sich keine Unterschiede unter den exponierten und nicht exponierten Platten konstatieren.

Dauer der Exposition 48 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Spärliches Wachstum	Gutes Wachstum
1 : 500	„ „	„ „
1 : 1000	Mäßig gutes „	„ „
1 : 2000	Gutes Wachstum	„ „

In allen anderen Verdünnungen ließ sich kein Unterschied unter den exponierten und nichtexponierten Platten wahrnehmen.

Dauer der Exposition 4 Tage

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Spärliches Wachstum	Gutes Wachstum
1 : 500	„ „	„ „
1 : 1000	„ „	„ „
1 : 2000	Gutes „	„ „

In allen anderen Verdünnungen konnten keine Unterschiede unter den exponierten und nichtexponierten Platten gefunden werden.

---

1) Es ist nicht ausgeschlossen, diese Eigenschaft des Diphtheriebacillus und Typhusbacillus, die zweifellos auch andern mit relativ dünner Membran ausgestatteten Bakterien zukommt (Kokken und Sarcinen sind nach meinen Untersuchungen ausgeschlossen), als eine biologisch-kolorimetrische Methode zur Bestimmung des Eosingehalts bei sehr großer Verdünnung des Eosins zu gebrauchen.

4. Versuche mit „Eosin E. Merck bläulich".

A. Versuche mit Bacterium typhi.

a) Versuche im Dunkeln.

1. Wachstum im Brutschrank. Prüfung der Toxizität des Eosins.

Verdünnungen	Makroskopischer Befund
1:100	Gutes Wachstum. Kultur dickrot
1:500	„ „ „ stark rot
1:1000	„ „ „ rot
1:2000	„ „ „ blaßrot

Auf allen anderen Verdünnungen war gutes Wachstum eingetreten. Die Farbe war mehr oder weniger rot, je nach der mehr oder weniger großen Verdünnung des „Eosin bläulich".

Die Kulturen waren gegenüber den Färbungen bei „Eosin gelblich" stärker rot gefärbt.

Die Typhusbacillen zeigten im hängenden Tropfen wieder die charakteristische Körnchenfärbung. Der Bakterienkörper war blaßrötlich, die Körnchen dunkelrot gefärbt.

Die Agglutinationsprüfungen ergaben dasselbe Resultat, wie bei „Eosin gelblich", so daß es genügt, auf dieses zu verweisen. Die Agglutination war bei allen Kulturen nach 25 Minuten vollständig eingetreten.

b) Versuche im Hellen und Dunkeln. Prüfung der photodynamischen Wirkung des Eosin bläulich auf Typhusbacillen.

Dauer der Exposition 24 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Gutes Wachstum	Gutes Wachstum
1:500	„ „	„ „

In den übrigen Verdünnungen ließ sich kein Unterschied unter den exponierten und nicht exponierten Platten wahrnehmen.

Dauer der Exposition 72 Stunden

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Schwaches Wachstum	Gutes Wachstum
1:500	„ „	„ „
1:1000	Mäßig gutes „	„ „
1:2000	Gutes Wachstum	„ „

Auf den anderen Platten ließen sich keine Unterschiede unter den exponierten und nichtexponierten Platten konstatieren.

B. Versuche mit Corynebacterium diphtheriae.

Versuche im Hellen und Dunkeln.

Dauer der Exposition 4 Tage

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1:100	Sehr schwaches Wachstum	Gutes Wachstum
1:500	Schwaches „	„ „
1:1000	Spärliches „	„ „
1:2000	Schwaches „	„ „
1:3000	Gutes „	„ „

Auf den anderen Platten war überall gutes Wachstum eingetreten.

C. Versuche mit Sarcina flava.

a) Versuche im Dunkeln.

1. Wachstum im Brutschrank. Prüfung der Toxizität des Eosins bläulich.

Verdünnungen	Makroskopischer Befund
1 : 100	Sehr gutes Wachstum. Rot gefärbte Kultur. Nährboden stark rot
1 : 500	„ „ „ (gegenüber den größeren Verdünnungen sogar noch besseres Wachstum). Kultur rosa gefärbt, mit schwach gelblichem Schein. Nährboden rot
1 : 1000	Gutes Wachstum. Kultur gelbrot
1 : 2000	„ „ „ „
1 : 3000	„ „ „ „ Nährboden rosa
1 : 4000	Mäßig gutes Wachstum. Gelbrote Kultur
1 : 5000	Gutes Wachstum. Gelbliche Kultur. Nährboden rosa
1 : 10 000	„ „ Gelbe „ „ „
1 : 20 000	Mäßig gutes Wachstum. Gelbe Kultur. Blaßroter Nährboden
1 : 50 000	„ „ „ Kultur gelb. „ „
1 : 100 000	„ „ „ Gelbe Kultur. Blaßrötlicher „
1 : 500 000	„ „ „ „ „ Weißer „

In allen anderen Röhrchen waren dieselben Verhältnisse wie in der Verdünnung 1 : 500 000.

b) Versuche im Hellen und Dunkeln.

Sarcina flava zeigte sich den beiden Eosinarten gegenüber als sehr resistent.

Dauer der Exposition 4 Tage

Eosin gelblich Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Mäßig gutes Wachstum	Gutes Wachstum
1 : 500	Gutes Wachstum	„ „

Auf allen anderen Platten gutes Wachstum.

Eosin bläulich Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Gutes Wachstum	Gutes Wachstum

Auch auf allen anderen Platten gutes Wachstum.

D. Versuche mit Micrococcus rosaceus.

a) Versuche im Dunkeln.

1. Wachstum im Brutschrank. Prüfung der Toxizität des Eosins auf Micr. rosaceus.

Verdünnungen	Makroskopischer Befund
1 : 100	Sehr geringes Wachstum, Nährboden und Kultur rot
1 : 500	Mäßiges Wachstum. Nährboden rot. Kultur rot
1 : 2000	„ „ „ „ „ „
1 : 3000	„ „ „ rosa „ rosa
1 : 4000	„ „ „ „ „ „
1 : 5000	Gutes „ „ „ „ „
1 : 10 000	„ „ „ blaßrot „ „
1 : 20 000	„ „ „ „ „ „
1 : 100 000	„ „ „ weiß „ blaßrot
1 : 500 000	Schwaches „ „ „ „ „
1 : 1 000 000	Mäßig gutes Wachstum. „ „ „ „

b) Versuche im Hellen und Dunkeln.

Dauer der Exposition 3 Tage

Verdünnungen	Hell	Dunkel
1 : 100	Mäßig gutes Wachstum	Mäßig gutes Wachstum
1 : 500	Mäßiges Wachstum	Mäßiges Wachstum
1 : 2000	„ „	„ „

Auf den anderen Platten konnten nur sehr geringe Wachstumsunterschiede unter den exponierten und nicht exponierten Platten konstatiert werden. Die photodynamische Wirkung war demnach sehr minimal.

Zusammenfassung der bakteriologischen Resultate.

1) Fluorescein erwies sich in der Verdünnung 1 : 100 (Lösung mit $^1/_4$ Natronlauge) Typhusbacillen gegenüber giftig. Die Giftwirkung ist außer dem Fluorescein der Natronlauge zuzuschreiben.

2) Die Agglutinierbarkeit der auf den Verdünnungen 1 : 1000 und 1 : 2000 gewachsenen Typhusbakterien war etwas geschwächt. Die Agglutination war nach 25 Minuten noch nicht vollständig eingetreten, erst nach 35 Minuten.

3) Die photodynamische Wirkung des Fluoresceins ist bei 24-stündiger Exposition in der Verdünnung von 1 : 1000 bemerkbar; bei einer Exposition von 48 Stunden ist die photodynamische Wirkung auch in der Verdünnung von 1 : 2000 bemerkbar. Die photodynamische Wirkung des Fluoresceins auf Bact. typhi ist sehr schwach.

4) Typhusbacillen gehen auf ungefärbtem Agar-Agar-Nährboden selbst bei einer Exposition von 4—6 Tagen in diffusem Tageslicht nicht zu Grunde. Sonnenlicht tötet nach 15 Stunden. Bei letzterem konnte eine Beschleunigung der Abtötung auf Fluoresceinnährböden nicht konstatiert werden.

5) Die Anwendung von Gelatine und Bouillon bewirkten keine wesentlichen Unterschiede in der photodynamischen Wirkung des Fluoresceins.

6) Die von der Lösung von Fluorescein ausgehenden Strahlen hatten auf Typhusbakterien keine Einwirkung bei einer Exposition von 6 Stunden im Sonnenlicht. Bei einer 15-stündigen Exposition war eine geringe Schädigung bemerkbar. Wo Sonnenlicht also abtötend gewirkt hatte, konnte bei Vorschaltung eines Strahlenfilters, bestehend aus einer stark fluoreszierenden Lösung von Fluorescein, nur eine Wachstumshemmung konstatiert werden.

7) Fluorescein wirkte in der Verdünnung von 1 : 100 und 1 : 2000, 1 : 5000, 1 : 10000 auf Corynebacterium diphtheriae giftig.

8) Die photodynamische Wirkung des Fluoresceins auf Corynebacterium diphtheriae ließ sich bis zu einer Verdünnung von 1 : 60000 bei Exposition von 24 Stunden deutlich erkennen. 48-stündige Exposition hatte eine noch intensivere Einwirkung zur Folge.

9) Corynebacterium diphtheriae ließ sich selbst bei 4-tägiger Exposition in diffusem Tageslicht nicht abtöten. Im Sonnenlicht konnte nach 10-stündiger Exposition kein Wachstum mehr wahrgenommen werden.

10) Auch Corynebacterium erwies sich den mittels eines Strahlenfilters abfiltrierten Strahlen gegenüber als sehr resistent.

11) Die photodynamische Wirkung auf Sarcina lutea ist sehr gering.

12) Sarcina lutea wurde im Sonnenlicht nach 36-stündiger Exposition abgetötet.

13) Die Einwirkung des Fluoresceins im Dunkeln war bei Bacterium prodigiosum eine intensivere als bei Sarcina lutea.

14) Photodynamische Wirkung des Fluoresceins auf Bacterium prodigiosum ließ sich bis zu einer Verdünnung von 1 : 2000 erkennen.

15) Sonnenlicht bewirkte Abtötung von Bacterium prodigiosum nach 16-stündiger Belichtung.

16) Die photodynamische Wirkung des Fluoresceins ist auf Micrococcus rosaceus sehr gering. Dasselbe ist bei Micrococcus sulfureus der Fall.

17) Eine photodynamische Wirkung des Fluoresceins auf Actinomyces war selbst bei 3-tägiger Exposition nicht erkennbar.

18) Eine photodynamische Wirkung des Fluoresceins auf Saccharomyces rosaceus war nach 3-tägiger Exposition nicht zu erkennen.

19) Saccharomyces rosaceus starb im Sonnenlicht nach 30 Stunden.

20) Fluoresceinanilid wirkte in der Konzentration 1:100 auf Typhusbacillen giftig.

21) In der Verdünnung 1:1000 war nach 25 Minuten vollständige Agglutination eingetreten.

22) Photodynamische Wirkung des Fluoresceinanilids auf Typhusbakterien ließ sich nach 24 Stunden erkennen.

23) Schwache Photodynamie ließ sich bei 48-stündiger Exposition auch in der Verdünnung von 1:2000 konstatieren.

24) Fluoresceinanilid wirkte in der Verdünnung 1:100 auf Corynebacterium diphtheriae giftig ein.

25) Photodynamische Wirkung des Fluoresceinanilids auf Corynebacterium diphtheriae ließ sich bei 24-stündiger Exposition in den Verdünnungen 1:1000 und 1:2000 deutlich erkennen.

26) Tötung von Corynebacterium diphtheriae bei Anwendung photodynamischer Substanzen im Hellen erfolgte nach 5-tägiger Exposition in der Verdünnung 1:1000.

27) Auf Sarcina lutea wirkte Fluoresceinanilid nach 24-stündiger Exposition in den Verdünnungen 1:1000 und 1:2000 photodynamisch ein. Bei 48-stündiger Exposition bis zu den Verdünnungen 1:10000.

28) Die photodynamische Wirkung des Fluoresceinanilids war auf Micrococcus rosaceus ähnlich stark wie auf Sarcina lutea.

29) Auf Actinomyces wirkte Fluoresceinanilid wesentlich stärker photodynamisch ein als Fluorescein, ebenso auf Sacch. rosaceus.

30) Eosin gelblich und Eosin bläulich bewirkten charakteristische Körnchenfärbungen des Typhusbakteriums in lebendem Zustande. Die Färbung läßt sich zur Differentialdiagnose von Bact. typhi und Bact. coli verwenden.

31) Die Typhusbakterien extrahieren den Farbstoff dem Nährmedium.

32) Eine Giftwirkung übt Eosin selbst in der Verdünnung von 1:100 nicht aus.

33) Die photodynamische Wirkung des Eosins ist wesentlich stärker als die des Fluoresceins und Fluoresceinanilids.

34) Auch bei den Diphtheriebacillen war eine Extraktionswirkung zu konstatieren.

35) Die photodynamische Wirkung des Eosins auf Diphtheriebakterien war stärker als die auf Typhusbakterien.

36) Mäßige Extraktion des Farbstoffes bewirkten auch Sarcina flava und Micrococcus rosaceus.

Vorliegende Arbeit wurde im Jahre 1906 und 1907 ausgeführt, die chemischen Untersuchungen im Frühjahr und Sommer 1906 im chemischen Laboratorium der Kgl. Technischen Hochschule Stuttgart, die bakteriologischen Untersuchungen im Laboratorium der städt. bakteriologischen Untersuchungsstation und in meinem Privatlaboratorium.

Literatur.

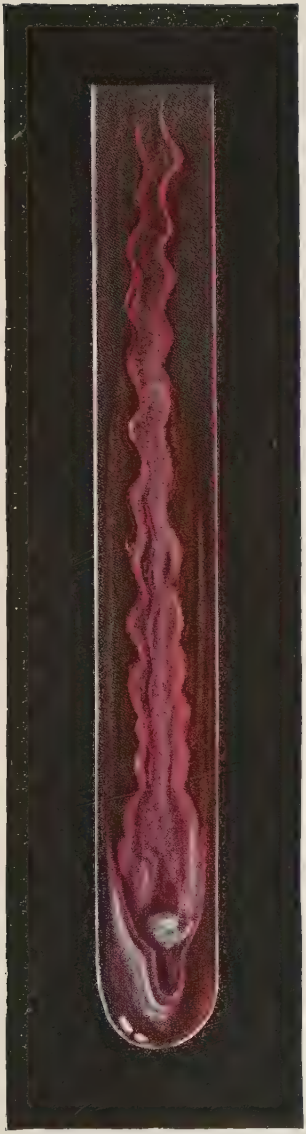
1) Raab, Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. (Zeitschr. f. Biologie. Bd. XXXIX. 1900. Heft 4.)

2) v. Tappeiner, Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien, nach Versuchen von O. Raab. (Münch. med. Wochenschr. 1900. No. 1.)

Tafel II.

Bacterium prodigiosum
(Agarkultur).

Bacterium prodigiosum
(Agarkultur).



Tafel III.

Micrococcus sulfureus
(Agarkultur).

Tafel IV.

Saccharomyces rosaceus
(Agarkultur).

Tafel V.

Saccharomyces rosaceus
(Kartoffelkultur).

Tafel V.

Tafel VI.

Micrococcus rosaceus
(Agarkultur).

Tafel VII.

Actinomyces
(Agarkultur).

Tafel VII.

Actinomyces

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 3298